Replikation und Expression bei Mausadenovirus FL

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gerhard Antoine

am
24. 1. 1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0007

Replikation und Expression bei Mausadenovirus FL

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gerhard Antoine

am
24. 1. 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 2. 1984

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Antoine, G., Aleström, P., Schilling, R., Pettersson, U. and Winnacker, E.-L. (1982). Defective expression of mouse adenovirus FL in human cells. The EMBO Journal 1, 453-459.

Lally, C., Dörper, T., Gröger, W., Antoine, G. and Winnacker, E.-L. (1984). A size analysis of the adenovirus replicon. The EMBO Journal 3, 333-337.

Temple, M., Antoine, G., Delius, H., Stahl, S. and Winnacker, E.-L. (1981). Replication of mouse adenovirus strain FL DNA. Virology 109, 1-12.

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand während der Zeit von November 1979 bis November 1983 am Institut für Biochemie der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker. Ihm möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau R. Schilling, die sich durch ihre wertvolle Mitarbeit als große Hilfe erwies.

Ebenso danke ich Frau C. Lally, Frau G. Kausel und Herrn W. Gröger für die Zusammenarbeit.

Für die Durchführung der Hybridisierungsexperimente bedanke ich mich bei den Herren Dr. Aleström und Prof. Dr. Pettersson, Uppsala.

Auch danke ich Frau Dr. R. Scheid, die mir bei der Herstellung eines Antiserums gegen AdFL behilflich war, den Herren Dr. Pünter von der Hoechst AG und Prof. Dr. L. Philipson, EMBL, Heidelberg, die mir verschiedene Antiseren überlassen haben.

Herrn Moosbauer möchte ich für die Konstruktion der Gelapparaturen für die DNA-Sequenzierung und seine wertvollen technischen Ratschläge danken.

Meiner Schwester Brigitte und meiner Frau Gisela danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung des vorliegenden Skriptums.

Ferner sei allen meinen Kolleginnen und Kollegen in unserem Labor, die ich hier namentlich nicht aufgeführt habe, mein Dank gesagt für ihre guten Ratschläge, ihre Unterstützung bei der Arbeit und ihre Geduld.

A INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Adenoviren - ein allgemeiner Überblick	1
1.2	Aufbau der Adenoviren	2
1.3	Die Replikation viraler DNA	3
1.4	Transkriptionsprozesse und Proteinsynthese in infizierten Zellen	6
1.5	Mausadenovirus FL	8
1.6	Aufgabenstellung	10
2.	MATERIAL	11
2.1	Zellen und Virusmaterial	11
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	11
2.3	Seren	11
2.4	Medien	11
2.5	Enzyme	12
2.6	Chemikalien und andere Materialien	12
2.7	Lösungen	14
3	METHODEN	16
3.1	Zellen und Virus	16
3.1.1	Zellkultur	16
3.1.2	Test auf Mykoplasmen	16
3.1.3	Virusvermehrung	17
3.1.4	Herstellen von Virusstämmen für die Infektion von Zellkulturen	18
3.1.5.	Reinigung von Virus aus Zellkulturen	18

3.1.6	Bestimmung des Virustiters durch indirekte Immunfluoreszenz - Nachweis viraler Antigene	19
3.1.7	^{3}H-Thymidin Pulsexperimente zur Untersuchung der DNA-Synthese	20
3.1.8	^{35}S-Methionin Pulsexperimente zur Untersuchung der Proteinsynthese	20
3.2	Charakterisierung viraler DNA aus Zellkulturen	21
3.2.1	Isolierung von DNA aus gereinigten Viruspartikeln	21
3.2.2	Isolierung viraler DNA aus Zellkulturen durch Hirtextraktion	21
3.2.3	Reinigung viraler, radioaktiv markierter DNA aus Zellextrakten durch Rohrzucker-Gradientenzentrifugation	22
3.2.4	Restriktionsverdauungen viraler DNA	22
3.3	Charakterisierung von Proteinen	23
3.3.1	Herstellung von Antikörpern gegen virale Strukturproteine	23
3.3.2	Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen	23
3.3.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	25
3.3.4	Transfer von Proteinen aus Gelen auf Nitrozellulosefilter (Western Blotting)	26
3.3.5	Immunologischer Nachweis viraler Proteine auf Nitrozellulosefiltern	27
3.3.6	Immunpräzipitation viraler Proteine	28
3.4.	Charakterisierung von RNA	29
3.4.1	Isolierung zytoplasmatischer RNA	29
3.4.2	Auftrennung von RNA auf Agarosegelen	30
3.4.3	Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung mit DNA-Fragmenten (Northern Blotting)	32
3.5	Enzymatische Reaktionen an freier DNA	33
3.5.1	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	33
3.5.2	Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch Alkalische Phosphatase	34
3.5.3	^{32}P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotid-Kinase	35

3.5.4	Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	36
3.6	Charakterisierung von DNA	36
3.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.6.3	Gelelektrophorese auf Mischgelen	38
3.6.4	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.6.5	Transfer von DNA von Agarosegelen auf Nitrozellulose-Filter (Southern Blotting)	39
3.6.6	Radioaktive Markierung von DNA durch Nicktranslation	41
3.6.7	DNA/DNA-Hybridisierung nach Southern	41
3.6.8	DNA-Sequenzierung	42
3.7	Klonieren viraler DNA-Fragmente in E.coli	43
3.7.1	Vorbereitung des Vektors	43
3.7.2	Vorbereiten der Restriktionsfragmente	44
3.8	Bakterienzucht	45
3.8.1	Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten	45
3.8.2	Aufzucht von Bakterien in Flüssigkultur	45
3.8.3	Herstellen transformationskompetenter Bakterien	46
3.8.4	Transformation von Bakterien	46
3.8.5	Aufbewahrung von Bakterienstämmen	47
3.9	Identifizierung rekombinanter Plasmide	47
3.9.1	Schnellmethoden zur Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden	47
3.9.2	Reinigung der Plasmid-DNA durch Gradientenzentrifugation	49
3.9.3	Reinigung von Plasmid-DNA über Säulenchromatographie	50
3.9.4	Kolonie-Hybridisierung	50

4.	ERGEBNISSE	52
4.1	Bildung interfektiöser Viruspartikel in HeLa- und 3T3-Zellen	52
4.2	Infektionsverlauf in AdFL-infizierten Zellen	55

4.3	DNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen	55
4.4	Synthese später Proteine in HeLa- und 3T3-Zellen	62
4.4.1	Darstellung der Strukturproteine von AdFL im Vergleich zu Ad2	62
4.4.2	Nachweis virusspezifischer Proteinsynthese durch Pulsexperimente mit ^{35}S-Methionin	65
4.4.3	Immunpräzipitation viraler Strukturproteine	69
4.4.4	Identifizierung viraler Strukturproteine durch "Blotting"	75
4.4.5	Einfluß der Infektionsmultiplizität auf die Proteinsynthese	79
4.5	Synthese viraler RNA in HeLa- und 3T3-Zellen	80
4.6	Klonierung von Mausadenovirus-DNA-Fragmenten	84
4.6.1	Klonierung eines Fragmentgemisches	85
4.6.2	Klonieren gereinigter Mausadenovirus-PstI-Fragmente	89
4.6.3	Die Klonierung von terminalen Mausadenovirus-DNA-Fragmenten	94
4.7	Identifizierung und Kartierung klonierter AdFL-Restriktionsfragmente	98
4.7.1.	Identifizierung rekombinanter Plasmide durch Kolonie-Hybridisierung	98
4.7.2	Identifizierung von Klonen durch Hybridisierung nach Southern (Southern, 1975)	100
4.7.3	Kartierung von AdFL-PstI-Klonen	103
4.7.4	Sequenzierung klonierter AdFL-Endfragmente	116
4.8	Konstruktion einer Restriktionskarte von Mausadenovirus anhand klonierter PstI-Fragmente	123

5.	DISKUSSION	127
5.1.	Permissivität verschiedener Zellsysteme gegenüber einer AdFL-Infektion.	127
5.2.	DNA-Replikation.	129
5.3.	Das AdFL-Hexon - Sequenzhomologien zwischen AdFL und menschlichen Adenoviren.	134

5.4. Transkription. 137
5.5. Klonierung und Kartierung von AdFL. 139

6. ZUSAMMENFASSUNG 142

7. LITERATURVERZEICHNIS 143

B VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tab. 3-1: Ausgangslösungen für neutrale Rohrzuckergradienten 22

Tab. 3-2: Immunisierung eines Kaninchens mit AdFL 24

Tab. 3-3: Herstellen eines 15%igen Proteingels 25

Tab. 3-4: Versuchsbedingungen für Restriktionsverdauungen 33

Tab. 4-1: Permissivität von HeLa- 3T3-Zellen gegenüber einer Infektion mit AdFL. 54

Tab. 4-2: Ergebnis der Klonierung eines AdFL-PstI-Fragmentgemisches in pBR322. 86

Tab. 4-3: Aufstellung der klonierten AdFL-Restriktionsfragmente. 91

Tab. 4-4: Radioaktivitätsbilanz einer Sequenzierung 121

Abb. 1-1: Modell der Replikation von Adenoviren 4

Abb. 1-2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von AdFL-Partikeln 8

Abb. 3-1: Aufbau eines Elektroblots für den Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosefilter. 27

Abb. 3-2: Flachgelapparatur mit Pufferrezirkularisation zur Auftrennung von RNA. 32

Abb. 3-3: Transferverfahren. 40

Abb. 4-1: Immunfluoreszenz AdFL-infizierter 3T3- und HeLa-Zellen. 61

Abb. 4-2: Untersuchung der DNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen durch Pulsexperimente. 56

Abb. 4-3: Kinetik der AdFL-DNA-Synthese. 58

Abb. 4-4: Charakterisierung der DNA in AdFL-infizierten HeLa- und 3T3-Zellen. 59

Abb. 4-5: Restriktionsmuster von AdFL-DNA. 61

Abb. 4-6: Virusspezifische DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion. 61

Abb. 4-7: Strukturproteine von AdFL (links). 64

Abb. 4-8:	Zeitlicher Ablauf der Proteinsynthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen spät nach Infektion	64
Abb. 4-9:	Proteinsynthese in AdFL-infizierten 3T3-Zellen.	67
Abb. 4-10:	Proteinsynthese in AdFL-infizierten HeLa-Zellen.	67
Abb. 4-11:	Spezifität verschiedener Antiseren.	70
Abb. 4-12:	AdFL-Hexon-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen.	70
Abb. 4-13:	Synthese des AdFL-Hexon-Proteins in infizierten 3T3- und HeLa-Zellen.	70
Abb. 4-14:	Synthese verschiedener Proteine in 3T3- und HeLa-Zellen als Folge einer Infektion mit AdFL	74
Abb. 4-15:	Nachweis virusspezifischer Proteine in Extrakten AdFL-infizierter 3T3- und HeLa-Zellen durch Immunoblots.	77
Abb. 4-16:	Abhängigkeit der AdFL-Hexon-Synthese in infizierten HeLa- und 3T3-Zellen von der Multiplizität der Infektion.	83
Abb. 4-17:	RNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion	83
Abb. 4-18:	Genetische Karte von pUC-Plasmiden	90
Abb. 4-19:	Klonierung eines AdFL-PstI-Fragmentgemischs in pBR322.	93
Abb. 4-20:	pUC8-transformierte Bakterienkolonien.	93
Abb. 4.21:	Klonierte DNA-Fragmente von AdFL	93
Abb. 4.22:	Strategie der Klonierung terminaler AdFL-DNA-Fragmente (PstI F und PstI H) von Mausadenovirus FL	96
Abb. 4-23:	Koloniehybridisierung nach Grunstein und Hogness	102
Abb. 4-24:	Charakterisierung rekombinanter Plasmide durch Southernblot-Hybridisierungen.	102
Abb. 4-25:	Agarosegel zur Kartierung von Klon 1701.	105
Abb. 4-26:	Agarosegel zur Kartierug des AdFL-PstI-B-Fragments (Klon 252).	105
Abb. 4-27:	Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-C-Fragments (Klon 224).	105

Abb. 4-28: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-D-Fragments (Klon 276). 105
Abb. 4-29: Agarosegel zur Kartierung des PstI-E-Fragments 107
Abb. 4-30: Agarosegel zur Kartierung des PstI-F-Fragments 107
Abb. 4-31: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-G-Fragments (Klon 553): 107
Abb. 4-32: Agarosegel zur Kartierung des PstI-H-Fragments 107
Abb. 4-33: Agarosegel zur Kartierung des PstI-I-Fragments 109
Abb. 4-34: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-K- und L-Fragments (Klone 533 und 511). 109
Abb. 4-35: Agarosegel zur Kartierung von AdFL-DNA. 109
Abb. 4-36: Restriktionskarte von Klon 1701. (Teil des PstI-A-Fragments) 110
Abb. 4-37: Kartierung der Klone 252 und 256, die das AdFL-PstI-B-Fragment enthalten 111
Abb. 4-38: Kartierung von Klon 224, der das AdFL-PstI-C-Fragment enthält 111
Abb. 4-39: Kartierung von Klon 276 mit AdFL-PstI-D-Fragment 112
Abb. 4-40: Kartierung der Klone 154 (pBR322) und 561 (pUC7), die das AdFL-Pst-E-Fragment enthalten 113
Abb. 4-41: Kartierung von Klon 1127, der das PstI-F-Fragment vom linken Ende des AdFL-Genoms enthält 114
Abb. 4-42: Kartierung von Klon 553 (pUC7), der das AdFL-PstI-G-Fragment enthält. 114
Abb. 4-43: Kartierung von Klon 613 (pUC8), der das PstI-H-Fragment vom rechten Ende des AdFL-Genoms enthält 115
Abb. 4-44: Kartierung des AdFL-PstI-J-Fragments (Klon 543-pUC7) 115
Abb. 4-45: Kartierung der Klone 145 (pBR322) und 533 (pUC7), die das AdFL-PstI-K-Fragment enthalten 116
Abb. 4-46: Kartierung von Klon 511 (pUC7), der das PstI-L-Fragment enthält 116
Abb. 4-47: Strategie der Sequenzierung klonierter Endfragmente 118
Abb. 4-48: Sequenzierung klonierter Endfragmente. 119

Abb. 4-49: Sequenzierung klonierter Endfragmente. 120
Abb. 4-50: Sequenzierung des rechten Endfragments (Klon pGA 613). 120
Abb. 4-51: Sequenz der Molekülenden von AdFL-DNA. 122
Abb. 4-52: Restriktionskarte von Mausadenovirus FL. 125
Abb. 5-1: Sequenzvergleich der DNA-Enden verschiedener Adenoviren. 131
Abb. 5-2: Sequenzhomologien zwischen AdFL und Ad2 136

C ABKÜRZUNGEN

Ad2	Adenovirus Typ 2
AdFL	Mausadenovirus Stamm FL
Ap^r	Ampicillin resistent
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DBP	DNA Bindendes Protein
DMAPN	3-(Dimethylamino)-Propionitril
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
ffu	focusforming unit (Zahl der Viruspartikel, die in der Immunfluoreszenz positive Zellen hervorrufen)
hpi	Stunden nach Infektion
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA ("messenger"-RNA)
OD	Optische Dichte
PBS-d	Phosphatgepufferte Salzlösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}+)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
pTP	Vorläufer des Terminalen Proteins
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Lösung

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Lösung
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TP	Terminales Protein
TS	Trisgepufferte Salzlösung
UV	ultra-violett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid
µCi	Mikrocurie
µM	Mikromolar

1. EINLEITUNG

1.1 Adenoviren - ein allgemeiner Überblick

Die Entdeckung der Adenoviren geht auf die Jahre 1952-1953 zurück (Rowe et al., 1953; Hilleman und Werner, 1954). Erstmals wurden sie in den Rachenmandeln (= adenoids) gefunden, auf welche auch der Name "Adenoviren" zurückzuführen ist. In der Folgezeit konnte man zahlreiche weitere Adenoviren nicht nur im Menschen, sondern auch in anderen Vertebraten (Affe, Hund, Rind, Maus, Vogel) identifizieren (Übersichtsartikel: Pereira, 1975).

Unter den menschlichen Adenoviren konnte man bislang 41 Serotypen bestimmen (Wadell et al., 1983), die, je nach ihren biologischen oder physikalisch-chemischen Eigenschaften, in 5 bis 7 verschiedene Gruppen zusammengefaßt werden. Am bekanntesten sind die Einteilungen nach der Onkogenität der verschiedenen Viren (Huebner et al., 1965), nach der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt) und nach der in Hybridisierungsexperimenten ermittelten Verwandtschaft der DNA-Sequenzen (Pina und Green, 1965; Green et al., 1979).

Die medizinische Bedeutung der menschlichen Adenoviren ist beträchtlich. Neben den bereits erwähnten Infektionen des Respirationstraktes verursachen sie Augenerkrankungen (z.B. Ad19) und Durchfall bei Kindern (Ad40, Ad41) oder sind zumindest daran beteiligt. Sehr bedeutend für das Verständnis der Adenovirus/Zellwechselwirkungen war die Entdeckung der Onkogenität einiger Adenoviren in Hamstern (Trentin et al., 1962).

Da sich viele Adenoviren im Verhältnis zu anderen Viren (z.B. Pockenviren) als vergleichsweise apathogen erwiesen, konnte man sie als Schlüssel zum Verständnis der molekularen Biologie der eukaryotischen Zelle verwenden. Zu einem Zeitpunkt, da man noch weit davon entfernt ist, die biochemischen Vorgänge und die Regulation in einer prokaryotischen und noch viel weniger die der wesentlich komplizierteren eukaryotischen Zelle zu begreifen, galt

es zu versuchen, mit einfachen Modellen den Einstieg zu finden. Viren bieten generell diese Möglichkeit. Da sie sich nicht selbständig wie Zellen vermehren können, sind sie wenigstens zum Teil auf die Funktionen der Wirtszellen angewiesen. Auch die selbst eingebrachte genetische Information unterliegt selbstverständlich den Gesetzen der Zelle. So ist das sogenannte "Spleißen" (splicing) der mRNAs eines der Phänomene, das erstmals bei Adenoviren beobachtet wurde und das, wie sich später herausstellte, in eukaryotischen Systemen allgemein verbreitet ist (Chow et al., 1977; Berget et al., 1977). Darunter versteht man das Ausschneiden nicht-translatierter Bereiche aus dem mRNA-Vorläufer. Man beobachtete es erstmals bei den Transkripten, insbesondere der Hexon mRNA, die spät nach Infektion mit Adenoviren synthetisiert werden.
Interessante Erkenntnisse wurden bereits über die Adenovirus DNA-Replikation (Übersichtsartikel: Winnacker, 1978; Challberg und Kelly, 1982; Fütterer und Winnacker, 1984), die Transkription (Ziff, 1980; Roberts et al., 1982), die Rekombination (Meinschad und Winnacker, 1980; Meinschad, 1983; Boursnell und Mautner, 1981; Mautner und Boursnell, 1983), die Mechanismen, die zur Transformation eukaryotischer Zellen führen (Übersichtsartikel: Flint, 1981) und weitere molekulare Aspekte gewonnen. Obwohl wir diesen Untersuchungen schon einen recht umfassenden Einblick in die biologischen Vorgänge während einer Infektion mit Adenovirus verdanken, wird noch vieles geschehen müssen, um selbst ein so "einfaches" System zu verstehen.

1.2 Aufbau der Adenoviren

Im Grundaufbau sind alle Adenoviren gleich. Die Partikel haben einen Durchmesser von etwa 70 nm und besitzen keine Lipidmembran. Die äußere Hülle (Capsid) des Viruspartikels besteht aus 252 Capsomeren. Insgesamt 240 Hexoncapsomere ordnen sich in 20 gleichgroßen Dreiecksflächen zu einem Ikosaeder ("Zwanzigflächner") zusammen. Die 12 Ecken werden von Pentonmolekülen mit

je einem antennenartigen Fortsatz (Fiber) ausgefüllt. Dieses äußere Erscheinungsbild ist an elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut zu erkennen (siehe Abb.1-2). Im Inneren der Viruspartikel, dem sog. "Core", befinden sich verschiedene Proteine, die mehr oder weniger eng, teilweise histonartig (Protein VII) mit der DNA assoziiert oder, wie das Terminale Protein (55k-Protein), kovalent gebunden sind.

Die doppelsträngige, virale DNA ist linear und hat ein Molekulargewicht von 20 bis 25 x 10^6 Dalton (Green et al., 1967). Sie zeichnet sich durch zwei strukturelle Merkmale besonders aus:

- An beiden Enden ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 55000 Dalton (Ad2) kovalent gebunden (Robinson et al., 1973; Robinson und Bellet, 1974).
- Die DNA trägt an beiden Enden einen größeren Bereich invertierter repetitiver Sequenzen (ITR - Garon et al., 1972; Wolfson und Dressler, 1972), deren Primärstrukturen für verschiedene Adenoviren durch Sequenzierung ermittelt und miteinander verglichen wurden (Arrand und Roberts, 1979; Dijkema und Dekker, 1979; Tolun et al., 1979; Shinagawa und Padmanabhan, 1980; Temple et al., 1981; Garon et al., 1982; Stillman et al., 1982a; Brinckmann et al., 1983).

1.3 Die Replikation viraler DNA

Den strukturellen Besonderheiten der Enden des Adenovirus-DNA-Moleküls wurde deshalb so große Bedeutung beigemessen, weil sie wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der DNA-Replikation spielen. Der Initiationspunkt (Sussenbach und Kuijk, 1978; Ariga und Shimojo, 1978; Reiter et al., 1980) und der Terminationspunkt (Schilling et al., 1975; Tolun und Pettersson, 1975; Weingärtner et al., 1976; Sussenbach und Kuijk, 1977; Ariga und Shimojo, 1978) der Replikation liegen an den Molekülenden. Dies konnte durch den asymmetrischen Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in sog. "Pulse-Chase-Experimenten" gezeigt werden.

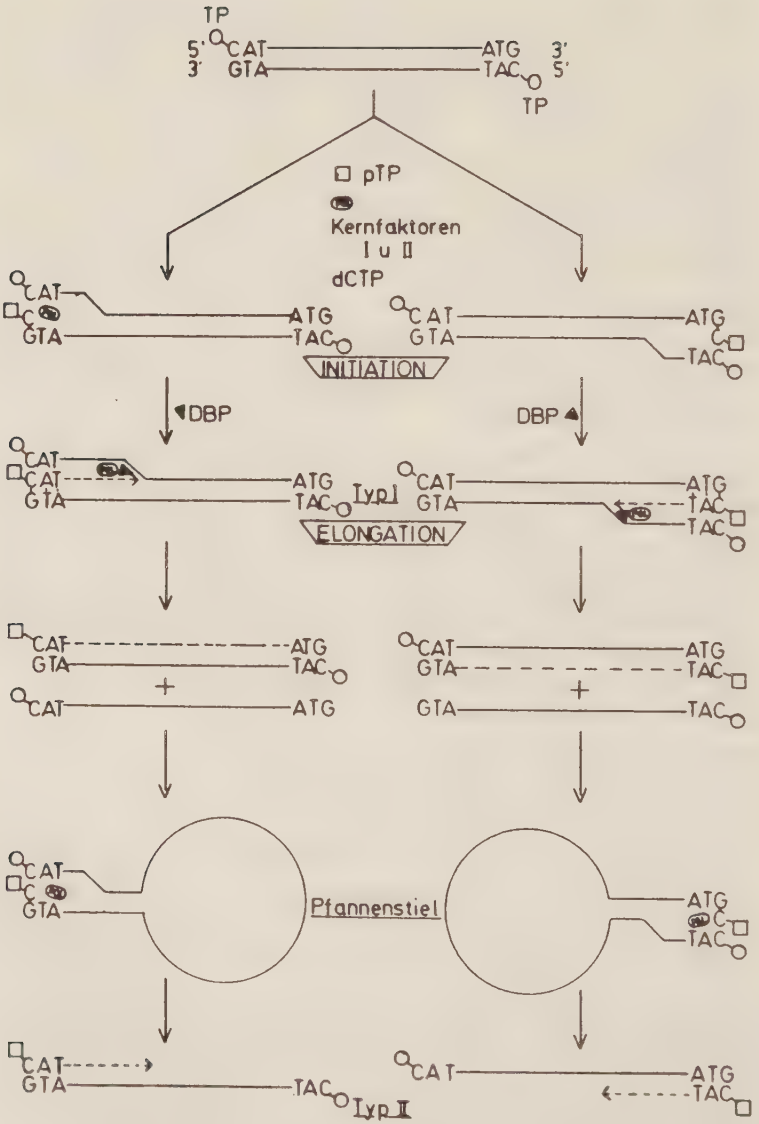


Abb. 1-1: Modell der Replikation von Adenoviren

Während der Replikation von Adenovirus-DNA, die bei Ad2 und Ad5 ca. 8 bis 10 Stunden nach der Infektion beginnt und 6 bis 10 Stunden später ihren Höhepunkt erreicht (Ginsberg et al., 1967; Pina und Green, 1969), entstehen ganz oder teilweise einzelsträngige Intermediate. Dies konnte erstmals durch Pulse-Chase-Experimente und anschließende Gradienten-Zentrifugation bewiesen werden, da solche Moleküle eine andere Schwimmdichte und andere Sedimentationsgeschwindigkeiten aufweisen als doppelsträngige DNA (van der Eb, 1973; Pettersson, 1973; Sussenbach et al., 1973).

Noch anschaulicher konnten die Zwischenformen im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden, wobei man lineare doppelsträngige DNA-Moleküle mit einem oder mehreren einzelsträngigen Schwänzen (Typ I) gefunden hat sowie Moleküle, die teilweise Einzel- und teilweise Doppelstrangcharakter aufweisen (Typ II - Lechner und Kelly, 1977; Revet und Benichou, 1981).

Diese Beobachtungen führten zu dem noch heute weitgehend gültigen Modell der DNA-Replikation von Adenoviren nach Lechner und Kelly (1977). Nach diesem Modell beginnt die Replikation meist an einem der beiden, selten an beiden Enden eines DNA-Moleküls. Die Synthese erfolgt in 5'-3'-Richtung, wobei der Elternstrang gleicher Orientierung verdrängt wird (Moleküle Typ I). Der freigesetzte Einzelstrang kann über seine invertierte terminale Repetition (ITR) eine sogenannte Pfannenstielstruktur ausbilden, deren doppelsträngiger Bereich genauso aussieht wie das Elternmolekül, von dem ursprünglich ausgegangen wurde. Die Replikation kann deshalb nach dem gleichen Mechanismus initiiert werden. Sobald dies geschehen ist, kann das Molekül wieder in die lineare Form übergehen (Moleküle Typ II) und zu Ende repliziert werden. Das Modell steht im Einklang mit den zuvor geschilderten Versuchsergebnissen. Sein schwacher Punkt ist die geforderte Pfannenstielstruktur, die man bisher in vivo nicht finden konnte (Revet und Benichou, 1981)

Dieses ursprüngliche Schema sagt jedoch nichts über die Enzyme aus, die an der Replikation beteiligt sind. Zunächst war vor allem unerklärlich, wie die Initiation ablaufen sollte, da alle bisher

bekannten DNA-Polymerasen eine freie 3'-Hydroxylgruppe benötigten, die sie als Startpunkt (primer) der Replikation benutzen können. Einen Ausweg fanden D. Rekosh et al. mit ihrem "protein priming"-Modell, wonach das terminale Protein die freie Hydroxylgruppe zur Verfügung stellen soll.
Zahlreiche Versuche mit temperatursensitiven Mutanten, Replikationshemmern wie Aphidicholin und in-vitro -Replikationssystemen ermöglichen es heute, ein weitgehend gesichertes, erweitertes Replikationsmodell aufzustellen (Abb.1-1). Das Terminale Protein (TP = 55k-Protein), das kovalent an die 5'-Enden des Elternmoleküls gebunden ist, bildet zusammen mit seinem neusynthetisierten Vorläufer (pTP = 80k-Protein) und einer viruskodierten Polymerase (140 k) einen Komplex (Lichy et al., 1982).Das pTP bindet kovalent einen d-CTP-Rest, also die erste Base des Tochterstranges und stellt damit das geforderte 3'-Hydroxylende zur Verfügung. Das DNA-bindende Protein ist bei der Elongation des Tochterstranges wichtig, scheint aber bei der Initiationsreaktion keine Rolle zu spielen (van Bergen und van der Vliet, 1983a)

1.4 Transkriptionsprozesse und Proteinsynthese in infizierten Zellen

Über die adenovirusspezifische Transkription wurden in den letzten Jahren so viele Daten gesammelt, daß eine detaillierte Erläuterung den Rahmen dieser Einleitung sprengen würde. Deshalb möchte ich mich auf die Beschreibung einiger allgemeiner Prinzipien beschränken und im übrigen auf die folgenden Übersichtsartikel verweisen: Ziff, 1980; Flint, 1981; und Roberts et al., 1982.
Man unterscheidet im Verlauf einer lytischen Infektion mit Adenovirus grundsätzlich zwei Phasen: eine sog. "frühe" und eine "späte" Phase. In der frühen Phase, die sich bis zum Beginn der DNA-Replikation etwa 6 bis 8 Stunden nach der Infektion (Ad2, Ad5) erstreckt, ist der Anteil virusspezifischer RNA im Verhältnis zur wirtsspezifischen noch sehr klein (0,1 %), wird aber auf der

Translationsebene bevorzugt (5-18 % der polyribosomalen RNA - Lindberg et al., 1972). Die Mengen an fruhen Proteinen sind deshalb ziemlich gering, was die Suche und Charakterisierung erschwert. Neuerdings erzielt man gute Erfolge mit monoklonalen Antikörpern (Zantoma, persönliche Mitteilung, 1983). Nachdem die gesamte DNA von Ad2 inzwischen sequenziert ist, kann man die offenen Leserahmen bestimmen, daraus die Größe der Proteine voraussagen und dann nach ihnen selbst suchen. Eine Zuordnung der gefundenen Proteine zu einer der sechs frühen Regionen (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4), d.h. zu einem der Bereiche auf dem DNA-Molekül, die früh nach Infektion exprimiert werden, ist aber schwierig.
Besonders intensiv befaßt man sich mit der E1A- und der E1B-Region am linken Ende des Adenovirus-Genoms. Diese beiden Bereiche sind auf noch nicht geklärte Weise für die Transformation der Wirtszelle verantwortlich (Gallimore et al., 1974; Graham et al., 1975; Bernards et al., 1983a; Bernards et al., 1983b; van den Elsen et al., 1983; Schrier et al., 1983). Darüber hinaus kommt ihnen bei der Kontrolle über die anderen frühen Regionen eine wesentliche Rolle zu (Jones und Shenk, 1979; Persson et al., 1981; Ricciardi et al., 1981; Carlock und Jones, 1981; Nevins, 1981, 1982; Solnick und Anderson, 1982; Montell et al., 1982; Shaw und Ziff, 1982; Cross und Darnell, 1983; Rossini, 1983). Großes Interesse verdient auch die Region E2A, die für das DNA-bindende Protein (DBP = 72k-Protein) kodiert. Es handelt sich dabei um ein multifunktionelles Protein (Kuijer et al., 1983), das sowohl früh nach der Infektion entsteht und dann regulatorische Funktion ausübt, als auch in der späten Phase in großen Mengen hergestellt wird und bei der DNA-Replikation entscheidend mitwirkt.
Der Beginn der späten Phase der lytischen Infektion fällt mit der DNA-Replikation zusammen. Die zellulären Funktionen sind weitgehend abgeschaltet, und der größte Teil der zytoplasmatischen mRNA ist viralen Ursprungs (Bhaduri et al., 1972; Tal et al., 1975). Die späten Regionen (L1-L5) haben gemeinsame "leader" - Sequenzen an den Positionen 16,5, 19,44 und26,38 (Chow et al., 1977; Berget et al., 1977; Klessig, 1977b; Akusjärvi und Pettersson, 1979; Zain et al., 1979). Die RNAs kodieren

hauptsächlich für Strukturproteine. Wahrscheinlich werden die frühen Regionen zumindest teilweise in der späten Phase der Infektion weiterhin transkribiert.

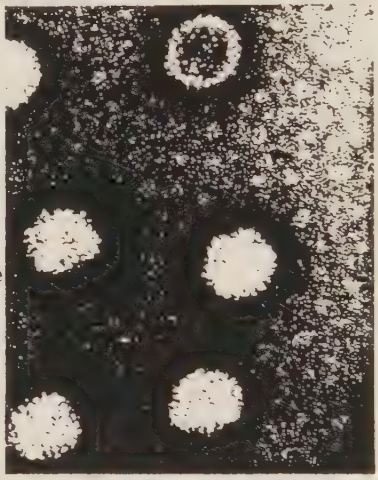


Abb. 1-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von AdFL-Partikeln

1.5 Mausadenovirus FL

Im Vergleich zu den menschlichen Adenoviren sind unsere Kenntnisse über Mausadenoviren bescheiden.

Es werden zwei Stämme von Mausadenovirus beschrieben. Stamm K 87 wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe aus dem Stuhl scheinbar gesunder Mäuse isoliert und charakterisiert (Hashimoto et al., 1966; Sugiyama et al., 1967). Den von uns benutzten Stamm FL isolierten erstmals Hartley und Rowe (1960). Im Gegensatz zum erstgenannten verursacht eine Infektion mit AdFL in neugeborenen Mäusen schwere Krankheitsbilder und führt nach einigen Tagen zum Tod (Hartley und Rowe, 1960; Heck et al., 1972). In verschiedenen Organen, darunter auch im Gehirn der infizierten Mäuse waren Einschlüsse in den Zellkernen und Nekrosen zu beobachten. Ältere Mäuse ließen nach Infektion meist keine offene Erkrankung erkennen, produzierten aber Antikörper und schieden über längere Zeit Virus aus. Ob der Stamm K 87 mit AdFL verwandt ist, wurde nie untersucht.

Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene wurden ab 1977 von unserem Arbeitskreis sowie von Larsen und Nathans durchgeführt. Mit immunologischen Methoden und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die Verwandtschaft zu den menschlichen Adenoviren

bestätigt. Gegen menschliche Adenoviren gerichtete Antiseren zeigen Kreuzreaktion mit AdFL (Larsen und Nathans, 1977). Im Elektronenmikroskop erkennt man die für Adenoviren typischen nackten ikosaedralen Partikel (siehe Abb. 1-2). AdFL ließ sich jedoch ausschließlich auf Mäusezellen vermehren (3T3, L-Zellen). In menschlichen Zellen (HEK, KB, HeLa und andere) konnte das Virus nicht wachsen.

Das Molekulargewicht der doppelsträngigen, linearen DNA wurde im Elektronenmikroskop durch einen Vergleich mit SV 40 DNA zu ca. 19,5 x 10^6 kD bestimmt. Die virale DNA weist alle adenovirusspezifischen Strukturmerkmale auf: Die Enden sind einer radioaktiven Markierung nicht zugänglich, was als Hinweis auf ein kovalent gebundenes Terminales Protein gilt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen einzelsträngiger DNA fand man ringförmige Strukturen, wie man sie vermuten muß, wenn die DNA-Moleküle eine terminale Repetition besitzen. Den endgültigen Beweis dafür konnte ich durch die Sequenzierung während meiner Diplomarbeit erbringen (Robinson et al., 1973; Garon et al., 1972; Wolfson und Dressler, 1972; Larsen und Nathans, 1977; Temple et al., 1981). Die invertierte terminale Repetition ist mit 93 Basenpaaren kürzer als die aller bisher bekannten menschlichen Adenoviren. Durch radioaktive Markierung replizierender DNA in Pulsexperimenten (Winnacker, E.L., 1978) wurde bewiesen, daß der Initiations- und der Terminationspunkt der Replikation wie bei den menschlichen Adenoviren an den Enden des DNA-Moleküls liegen (Temple et al., 1981).

Eine erste Restriktionskarte von AdFL wurde bereits 1977 veröffentlicht (Larsen und Nathans, 1977).Sie wurde in einer späteren Arbeit (Larsen et al., 1979) von 6 auf 19 Restriktionsenzyme erweitert.

Erste Arbeiten zur RNA-Synthese wurden 1983 in unserem Labor von Frau G. Kausel durchgeführt. Sie konnte in AdFL-infizierten 3T3-Zellen eine niedermolekulare RNA nachweisen, die möglicherweise der bei Ad2 beschriebenen VA-RNA entspricht. Abgesehen davon liegen bislang weder zur RNA-Synthese noch zur Proteinsynthese in AdFL Veröffentlichungen vor.

1.6 Aufgabenstellung

Für die geplante Entwicklung eines eukaryotischen Vektorsystems mit Mausadenovirus FL mußte zunächst eine geeignete Ausgangsbasis geschaffen werden. AdFL ist für eine solche Aufgabe besonders gut geeignet, weil die weit fortgeschrittene Genetik der Maus eine wichtige Grundlage für Testsysteme bietet. Außerdem entstehen während der DNA-Replikation von Adenoviren einzelsträngige Zwischenprodukte, die möglicherweise sehr viel leichter eine homologe Rekombination mit entsprechenden DNA-Sequenzen der Wirtszelle erlauben als doppelsträngige DNA. Auf diese Weise könnte es möglich sein, genetische Marker mit guten Ausbeuten in das Wirtsgenom einzuführen.

Um einen solchen viralen Vektor konstruieren zu können, ist es notwendig, den Mechanismus der DNA-Replikation des Virus zu kennen. Ihm galt deshalb unser besonderes Interesse. Erste Ergebnisse auf diesem Gebiet konnte ich bereits mit meiner Diplomarbeit erzielen, in deren Verlauf es mir gelang, die Sequenz der molekularen Enden der AdFL-DNA aufzuklären. Der Bereich der invertierten terminalen Repetition spielt eine entscheidende Rolle bei der Replikation des DNA-Moleküls.

Die Klonierung terminaler Restriktionsfragmente in einer autonom replizierenden Form sollte der nächste Schritt sein. Im Zusammenhang damit haben wir auch der Replikation von Mausadenovirus in menschlichen Zellen unser Interesse zugewandt und sind dabei auf das semipermissive AdFL-HeLa-System gestoßen. Nachdem wir festgestellt hatten, daß in dieser Wirtszelle keine Viruspartikel gebildet werden, sollten die molekularen Ursachen dieses Defekts näher untersucht werden. Bei der Charakterisierung klonierter AdFL-DNA-Fragmente schließlich erwies sich die veröffentlichte DNA-Restriktionskarte als unzulänglich. Sie sollte deshalb ergänzt und dort, wo es notwendig erschien, korrigiert werden.

2. MATERIAL

2.1 Zellen und Virusmaterial

HeLa-Zellen waren ein Geschenk von Dr. Williams, Glasgow.
Die Balb/c-3T3-Zellen stammen von Flow Laboratories.

Adenovirus Typ 2 war ursprünglich von Dr. W. Rowe, NIH, Bethesda, Maryland, USA erhalten worden.
Mausadenovirus FL war ursprünglich ein Geschenk von Dr. D. Nathans und wurde von Dr. M. Temple erneut aus einem Plaque gereinigt.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

E.coli HB101 (F^- pro leu thi lacY Str^r $r_k^- m_k^-$ Endo I^- rec A^-) wurde ursprünglich von Professor Goodman, Boston, USA, erhalten.
Stamm JM83 war ein Geschenk von Dr. M. Bröker.
pUC-Plasmide sowie pBR 322 waren ein Geschenk von Dr. M. Bröker.

2.3 Seren:

Flow Laboratories, Bonn: Kälberserum, fötales Kälberserum

2.4 Medien:

L-Broth (Bakterien): 10 g Bacto Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl ad 1 Liter;
Dulbecco's Medium (Zellkultur): beschrieben bei Dulbecco und Freeman (1959)

2.5 Enzyme

Restriktionsenzyme:
Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach, Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg, Boehringer, Mannheim sowie Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen oder von Mitarbeitern des Arbeitskreises gereinigt (BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI).

Andere Enzyme:
Boehringer, Mannheim: Lysozym; alkalische Phosphatase; Ribonuklease A; T4-DNA-Ligase, DNA-Polymerase I; T4-Polynucleotid-kinase
New England Biolabs, Schwalbach: T4-DNA-Ligase
E. Merck AG, Darmstadt: Proteinase K aus Pilzen
Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, USA:
DNase I (RNase frei)

2.6 Chemikalien und andere Materialien

Amersham und Buchler, Braunschweig:
5'-(γ)^{32}P-Adenosin-5'-Triphosphat, (3000 Ci/mMol), ^{32}P-Ortho-phosphat, (30-100 Ci/mg), 6-^{3}H-Thymidin, (22-30 Ci/mMol), L-^{35}S-Methionin (etwa 1000 Ci/mMol)

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:
Cäsiumchlorid (CsCl), Glycerin

Boehringer, Mannheim:
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), 2'-Deoxy-Adenosin-5'-Triphosphat (dATP), 2'-Deoxy-Cytidin-5'-Triphosphat (dCTP), 2'-Deoxy-Guanosin-5'-Triphosphat (dTTP), Chloramphenicol, Kalbsthymus-DNA, Lachssperma-DNA

Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Ca, USA:
Pansorbin

Dazey Products, Kansas, USA:
Plastikbeutel für Southernhybridisierungen

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast-Extract

Flow Laboratories, Bonn:
Gentamycin

Fluka AG, Buchs, SG:
Formamid

Kodak Limited:
Röntgenfilme X-Omat S, D19-Entwickler

LKB:
Ultrogel A4

E. Merck AG, Darmstadt:
Acridinorange, Aethanol, Aethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Ammoniumazetat, Ammoniumperoxodisulfat, Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Coomassie Brillantblau R 230, Dimethylamino-proprionitril (DMAPN), Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ficoll 400.000, Formaldehyd, Glycin, Glyoxal, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumnitrat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Phenol, Polyethylen-glycoll 6000, Trichloressigsäure (TCA), Triton X-100

Miles Laboratories:
FITC-markierte Antiseren

Nunc GmbH, Wiesbaden:
Petrischalen, Zellkulturflaschen

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden:
Dextransulfat, Ficoll 400, Sephadex-G50

C.Roth, Karlsruhe:
Dithiothreitol, Hydrazin, Piperidin

Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Kreis Einbeck:
Nitrozellulosefilterpapier BA85, Porengröße 0,45 µm

Serva, Heidelberg:
Acrylamid, Glaswatte, Harnstoff, 2-Mercaptoäthanol, N,N'-Methylbisacrylamid, Natriumsarkosyl, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Trifluortrichloräthan (Freon 113), Visking-Dialyseschläuche

Sigma Chemie GmbH, München:
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid (X-Gal), Agarose, Ampicillin, Dextransulfat, Ethidiumbromid, Ficoll, Rinderserumalbumin (BSA), Spermidin, Tetracyclin, tRNA aus Hefe, Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)

Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:
Glasfilter GF/A und GF/C, 3MM-Papier

Zinsser, Frankfurt:
Quickscint 501

2.7 Lösungen

Die verwendeten Lösungen sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt. Hier werden deshalb nur einige Stammlösungen und sehr häufig verwendete Puffer zusammengefaßt.

BND-A-Puffer: 250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8;
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8;
TN-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl;

Stammlösungen für Hybridisierungen:
Denhardt's (100 x konzentriert): 2 % BSA, 2 % Ficoll, 2 % PVP;
SSC-Lösung (20 x konzentriert): 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7;
SSPE-Lösung (20 x konzentriert): 3,6 M NaCl, 0,2 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,7, 20 mM EDTA;
Prähybridisierungsmix: 50 % Formamid, 5 x SSPE, 5 x Denhardt's, 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA;
Hybridisierungsmix: 50 % Formamid, 5 x SSPE, 1 x Denhardt's, 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA, 10 % Dextransulfat, radioaktiv markierte DNA-Probe

Gelelektrophorese:
TEB (DNA-Polyacrylamidgele): 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA;
Tris-Acetat-Puffer (DNA-Agarosegele): 40 mM Tris-acetat, 5 mM Na-acetat, 1 mM EDTA;
Phosphatpuffer (RNA-Gele): 20 mM Na-Phosphat, pH 7, 1 mM EDTA;
Glycinpuffer (Proteingele): 50 mM Tris, 0,4 M Glycin, 0,1 % SDS

Probenpuffer (DNA-Gele):
SDS-Stoppuffer: 10 mM Tris pH 8; 50 mM EDTA, 1 % SDS, 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 25 µg/ml XC, 30 % Glycerin.
Sucrose-Stoppuffer: 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 50 µg/ml Bromphenolblau, 42,5 % Rohrzucker.
Proteinpuffer (2 x konzentriert): 0,6 % SDS, 20 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau, 100 mM Tris pH 6,8, 1,4 mM Mercaptoäthanol.

3 METHODEN

3.1 Zellen und Virus

3.1.1 Zellkultur

Maus-Fibroblasten Balb/c-3T3 oder NIH/3T3 wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (Nunc; 75 cm^2) als Einschicht-Zellrasen (monolayer) bei 37°C kultiviert und vermehrt. Als Nährlösung diente Dulbecco's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959), das 5 % Serum aus neugeborenen Kälbern oder fötales Kälberserum enthielt. Wenn der Zellrasen etwa zu 3/4 dicht gewachsen war (nach 3 bis maximal 4 Tagen), wurde das Medium abgegossen. Die Zellen wurden einmal mit PBS-d (37°C) gewaschen und mit 1 ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen durch vorsichtiges Anschlagen der Flasche abgelöst werden konnten, wurden sie durch 1 ml Kälberserum vor weiterer Trypsinisierung geschützt und in eine neue Kulturflasche mit Medium übertragen. Die Passagen erfolgten gewöhnlich verdünnt im Verhältnis 1:3 bis 1:5. Danach wurden die Zellen ca. 15 Sekunden lang mit einem Luft-5%CO_2-Gemisch begast. Ähnlich wurden menschliche HeLa-Zellen behandelt. Die Passagen erfolgten meist 4-6 Tage später mit einer Verdünnung bis 1:10. Dem Medium wurden 10 % Kälberserum zugesetzt.
Um Zellen über längere Zeit aufzubewahren, wurden sie von einer Kulturflasche (75 cm^2) abgelöst, in 1ml Dulbecco's Medium mit 10 % Glyzerin aufgenommen und in Glasröhrchen eingeschmolzen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.2 Test auf Mykoplasmen

Um gegen Mykoplasmen vorzubeugen, wurde dem Medium neu aufgetauter Zellen über einige Passagen Gentamycin (50 µg/ml) zugesetzt. Außerdem wurden die Kulturen regelmäßig (mindestens alle 4 Wochen)

auf Mykoplasmen getestet (Russell, 1975; Lipp, 1981). Dazu wurden sie in Petrischalen auf sterilen Deckgläschen über Nacht herangezogen, einmal mit PBS-d oder trisgepufferter Kochsalzlösung (TS) gewaschen. Die Mykoplasmen wurden mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff (2-(2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl)-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol.3HCl), der in einer Endkonzentration von 10 µg/ml in Methanol gelöst war, 30 Minuten lang bei Raumtemperatur angefärbt. Danach wurde das Plättchen erneut mit PBS-d oder TS gewaschen, mit einem Tropfen Glyzerin-Puffer (1 Teil Glyzerin; 1 Teil 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Na_2HPO_4 pH 5,5) auf einem Objektträger fixiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei mykoplasmenfreien Zellen ist nur der Kern angefärbt (blaugrün). Bei Kontamination mit Mykoplasmen wird auch das Zytoplasma angefärbt, und zwischen den Zellen findet man oft fädige bis perlkettenartige, fluoreszierende Strukturen. Leichtere Kontamination hat wenig Einfluß auf die Virusproduktion der Zellen. Für in-vitro -Replikationsversuche waren kontaminierte Zellen ungeeignet. Deshalb wurden die Zellen nach einem positiven Mykoplasmentest durch neue ersetzt.

3.1.3 Virusvermehrung

Die Virusvermehrung erfolgte im wesentlichen wie bei Temple (1981) beschrieben. Für die Vermehrung von AdFL-Viren wurden 1/2 bis maximal 3/4 dicht gewachsene 3T3-Zellen einmal mit einer 1:1-Mischung aus Dulbecco's Medium und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (Winocour, 1963) gewaschen. Das Virus wurde in Dulbecco's Medium verdünnt, so daß die Infektion mit etwa einem infektiösen Partikel (1 ffu) pro Zelle erfolgte. Die Adsorption wurde mit 1-2 ml Viruslösung 1 Stunde lang durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 30 ml Dulbecco's Medium und 2 % Kalberserum aufgefullt, mit 5 % CO_2 begast und 3 bis 4 Tage lang bei 37°C weiter bebrütet.

3.1.4 Herstellen von Virusstämmen für die Infektion von Zellkulturen

Drei bis vier Tage nach der Infektion trat ein deutlicher zytopatischer Effekt bei den Zellen auf. Dann wurde das Medium vorsichtig abgegossen. Die Zellen wurden mit 2 ml Dulbecco's Medium mit 50 mM Tris-Base bei -20°C eingefroren, um eine Übersäuerung des Extraktes zu verhindern.
Um neue Zellkulturen zu infizieren, wurde die Stammflasche angetaut, und die Zellen wurden abgeschlagen. Die Zell-Virussuspension wurde in geeigneter Verdünnung als Inokulum verwendet.

3.1.5 Reinigung von Virus aus Zellkulturen

Die infizierten Zellen wurden, wie in 3.1.4. beschrieben, aufbewahrt, durch Einfrieren/Auftauen lysiert und von der Kulturflasche abgelöst. Wenn die Zellen in großen quadratischen Kulturschalen (Nunc 166508, 24x24cm) aufgezogen wurden, mußten sie während des Auftauens mit einem sterilen Gummiplättchen abgeschabt werden. Die Zellextrakte mehrerer Platten oder Kulturflaschen wurden vereinigt und 10 bis 20 Sekunden lang mit einem Branson Sonifier durch Ultraschall aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer abzutrennen, wurde das Lysat 10 Minuten in einer Tischzentrifuge mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Etwa 25 ml des Überstands wurden vorsichtig auf einen Stufengradienten, bestehend aus 3 ml Caesiumchlorid (1,5g/ml) und 5 ml Caesiumchlorid (1,2 g/ml) überschichtet. Die Caesiumchloridlösungen wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8,7 angesetzt. Für die erfolgreiche Virusreinigung ist es wichtig, die Caesiumchloridlösung mit der geringeren Dichte und den Zellextrakt vorsichtig mit einer Pipette übereinanderzuschichten und eine Durchmischung zu vermeiden. Die Zentrifugation erfolgte 90 Minuten bei 4°C mit 24000 Umdrehungen/Minute (rpm) in einem AH 627 Swingout-Rotor (DuPont/Sorvall). Die meist deutlich sichtbaren Virusbanden (oft waren es mehrere übereinander) aus 2 Stufengradienten wurden

vereinigt und in DuPont/Sorvall 03127 Röhrchen in einem TV 865 Vertikal-Rotor (DuPont/Sorvall) mindestens noch einmal für 2 1/2 bis 4 Stunden bei 4°C und 47000 rpm zentrifugiert. Mausadenovirus erscheint bei einer Dichte von 1,34 g/cm^3. Der Refraktionsindex beträgt 1,3657. Auf diese Weise gereinigtes Virus kann in Caesiumchlorid über mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden (vgl. Nathans, 1977; Temple, 1981).

3.1.6 Bestimmung des Virustiters durch indirekte Immunfluoreszenz - Nachweis viraler Antigene

Die Bestimmung des Virustiters und der Nachweis viraler Antigene erfolgte durch Immunfluoreszenz im wesentlichen wie bei Vogt (1969) beschrieben. 3T3-Zellen (oder auch menschliche Zellen) wurden in einer 30-mm-Petrischale auf einem sterilen Deckglas herangezogen. Wenn die Zellen etwa zu 3/4 konfluent waren, wurden sie mit geeigneten Virusverdünnungen infiziert (weniger als 1 ffu/Zelle). Zwei bis drei Tage nach der Infektion wurde das Medium abgesaugt; die Zellen wurden dreimal mit eiskalter Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TS) gewaschen und mit 3 ml -20°C kaltem absoluten Alkohol bei -80°C für mindestens 20 Minuten oder auch über Nacht fixiert. Danach wurden die Plättchen in eine neue Plastikschale transferiert. Die Zellen wurden erneut zwei- bis dreimal mit kaltem TS gewaschen, für einige Minuten an der Luft angetrocknet, mit 30-50µl 20-100fach verdünnter Antiserum-Lösung bedeckt und eine Stunde lang bei 37°C im Brutschrank unter einer wassergesättigten CO_2-Atmosphäre inkubiert. Dann wurden sie erneut mehrere Male gründlich gewaschen und, ebenso wie gerade beschrieben, mit einem FITC-markierten Anti-Kaninchen-Antikörper aus Schaf oder Ziege behandelt (FITC = Fluoresceinisothiocyanat). Die Deckgläschen wurden wieder gründlich mit TS gespült und mit einem Tropfen Glyzerin umgekehrt auf einem Objektträger fixiert. Die Zellen sind damit zwischen Objektträger und Deckglas eingebettet und konnen über Monate bei 4°C unter Lichtabschluß aufbewahrt werden. Die fluoreszierenden Foci wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 25fach vergrößernden Objektiv und

einem 10fach-Okular ausgezählt. Das kreisrunde Blickfeld wurde ausgemessen und das Verhältnis zur gesamten Petrischale berechnet. Der Mittelwert ergibt multipliziert mit 2700 den ffu-Wert für die ganze Petrischale. Virusstammlösungen, die wie in 3.1.4 beschrieben, hergestellt worden waren, enthielten nach dieser Bestimmungsmethode meist zwischen 10^7 und 2×10^8 ffu/ml (vgl. G.Kausel, 1983).
Da beim Fotografieren der leuchtenden Zellen meistens die Belichtungsautomatik der Kamera versagt, wurde meist manuell belichtet. Wenn ein 21-DIN-Film verwendet wurde, bewährten sich Zeiten von 1/2-1 Minute.

3.1.7 ^{3}H-Thymidin Pulsexperimente zur Untersuchung der DNA-Synthese

Pulsexperimente wurden mit Zellen in 30 mm Petrischalen durchgeführt.
Für einen ^{3}H-Thymidin Puls wurde das Medium bis auf einen Rest von 1 ml mit einer Pipette abgesaugt und durch 1 ml frisches Dulbecco's Medium mit 2 % fötalem Kälberserum und 2,5-5 µCi ^{3}H-Thymidin ersetzt. Dann wurde 2 Stunden lang weiterbebrütet. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden gründlich mit kaltem TS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

3.1.8 ^{35}S-Methionin Pulsexperimente zur Untersuchung der Proteinsynthese

Für eine Proteinmarkierung wurde das Medium vollständig entfernt, und die Zellen wurden zweimal mit methioninfreiem Dulbecco's Medium gewaschen. Die Proteine wurden 2-4 Stunden lang mit 10 µCi ^{35}S-Methionin in methioninfreiem Medium, gemischt mit 1/5 Volumen normalem Dulbecco's Medium, radioaktiv markiert. Danach wurde das radioaktive Medium entfernt, die Zellen wurden mehrmals mit kaltem TS mit 1,5 mM Phenylmethyl Sulfonyl Fluorid (PMSF - Proteaseinhibitor) gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

3.2 Charakterisierung viraler DNA aus Zellkulturen

3.2.1 Isolierung von DNA aus gereinigten Viruspartikeln

Mehrmals über Caesiumchlorid-Gradienten gereinigtes Virus wurde über Nacht, mindestens jedoch 2 Stunden lang, gegen kalten BND-A-Puffer (10 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA; 250 mM NaCl) dialysiert. Die viralen Proteine wurden mit Proteinase K verdaut. Dazu wurde die Viruslösung mit 1/20 Volumen 10%igem SDS (entspr. 0,5%ig) versetzt und mit 1/50 Volumen Proteinase K (10 mg/ml; entspricht 200 µg/ml Endkonzentration) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteinreste wurden durch zweimalige Phenolbehandlung mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol extrahiert. Danach wurde die DNA mehrere Tage zunächst gegen BND-A-Puffer und dann zweimal gegen TN-Puffer (10 mM Tris pH 7,4; 10 mM NaCl) dialysiert.

3.2.2 Isolierung viraler DNA aus Zellkulturen durch Hirt-extraktion

Durch eine modifizierte Hirtextraktion (Schilling, 1975) wurde virale DNA direkt aus Zellextrakten angereichert. Dazu wurden die Zellen einer 30-mm-Petrischale mit einem Gummiplättchen abgeschabt und ein Aliquot mit Lysispuffer versetzt oder direkt mit 0,7 ml Lysispuffer abgelöst (10 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA; 0,5 % SDS). Nach 3stündiger Proteinase-K-Verdauung (400 µg/ml Proteinase K) wurde die DNA-Lösung durch Zugabe von 200 µl NaCl (5 M) auf eine Endkonzentration von 1 M Kochsalz gebracht. Durch Kühlung auf 4°C über Nacht fiel die hochmolekulare Zell-DNA weitgehend aus und wurde dann durch dreißigminütige Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge (4°C) im Niederschlag abgetrennt. Der Überstand wurde 2 Stunden lang in BND-A-Puffer dialysiert, zweimal phenolisiert und so weiterbehandelt wie in 3.2.1 beschrieben.

3.2.3 Reinigung viraler, radioaktiv markierter DNA aus Zellextrakten durch Rohrzuckergradienten-Zentrifugation

^{3}H-Thymidin-markierte virale DNA aus Pulsexperimenten wurde auf 5-20%igen neutralen Rohrzuckergradienten zentrifugiert (Kathmann, 1976). Diese wurden aus je 2 ml einer 5%igen und einer 20%igen Rohrzuckerlösung (siehe Tabelle 3-1) in einem Gradientenrührer gemischt und auf ein 50%iges Rohrzuckerpolster (0,3 ml) in ein 4,6-ml-Zentrifugenröhrchen (DuPont/Sorvall 03127) gegossen. Die ^{3}H-markierten Zellen wurden aufgetaut, mit einem Gummiplättchen abgeschabt und ganz oder teilweise zusammen mit dem gleichen Volumen Lysispuffer und ^{14}C-Ad2-DNA als Marker über den Gradienten geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation in einem AH 650-Swingout-Rotor (DuPont/Sorvall) bei 4°C, 135 Minuten lang mit 47000 rpm. Um die Gradienten zu ernten, wurde eine Glaskapillare vorsichtig bis zum Boden geführt. Der Gradient wurde dann von unten her abgepumpt und in Fraktionen von 3-5 Tropfen mit einem Fraktionskollektor gesammelt. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde im Szintillationszähler gezählt.

	Ausgangs-konzentr.	End-konzentr.	20 ml 5%ige Lösung	20 ml 20%ige Lösung
Rohrzuckerlsg.	50 %	5 % / 20 %	2 ml	8 ml
Tris-HCl pH 8	1 M	10 mM	0,2 ml	0,2 ml
NaCl	5 M	1 M	4 ml	4 ml
EDTA	0,2 M	5 mM	0,5 ml	0,5 ml
H_2O	-	-	11,3 ml	5,3 ml
Sarcosyl	10 %	1 %	2 ml	2 ml

Tab . 3-1: Ausgangslösungen für neutrale Rohrzuckergradienten

3.2.4 Restriktionsverdauungen viraler DNA

Die bei den Restriktionsverdauungen verwendeten Puffer werden später beschrieben (3.5.1).

Die DNA aus den Hirtextraktionen wurde nach der Dialyse mit Äthanol gefällt und in einem geeigneten Restriktionspuffer aufgenommen.
Die Gipfelfraktionen der viralen DNA aus den Rohrzuckergradienten wurden vereinigt, dialysiert, phenolisiert und erneut dialysiert, wie in 3.2.1 beschrieben. Nach der Fällung der DNA erfolgte ihre Verdauung in einem geeigneten Restriktionspuffer.

3.3 Charakterisierung von Proteinen

3.3.1 Herstellung von Antikörpern gegen virale Strukturproteine

Die Zeitpunkte der Immunisierung eines Kaninchens und der Blutentnahmen können der nachfolgenden Tabelle 3-2 entnommen werden. Für die Immunisierung wurde über einen Caesiumchlorid-Gradienten gereinigtes Virus gegen steriles TS dialysiert, mit 1/100 Volumen 10%igem SDS auf insgesamt 0,1 % SDS gebracht, 3 Minuten lang gekocht und erneut gegen TS dialysiert. Bei der ersten Immunisierung wurde das selbe Volumen Freunds Adjuvans hinzugefügt. Die Injektionen erfolgten subcutan in den Rücken eines Kaninchens.
Für die Abtrennung des Serums wurde das entnommene Blut zunächst 2 Stunden lang bei 37°C und dann weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge konnte das Serum als gelblicher klarer Überstand abgenommen werden. Es wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen

^{35}S-markierte oder auch unmarkierte Proteine aus Zellextrakten oder aus gereinigten Viruspartikeln wurden, auf 15%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelen, modifiziert nach Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels kann der Tabelle 3-3 entnommen

Datum	Wochen nach Erstimmunisierung	Blutentnahme	Immunisierung	Serum (Bezeichnung)	Immunfluoreszenz
30.10.80	-	0,2 ml aus Ohrarterie	-	OA	(-)
31.10.80	-	0,6 ml aus Ohrarterie	0,5 ml AdFL (1,8 mg/ml) + 0,5 ml Freund's Adjuvans Subcutan in Rücken	OB	(-)
2.12.80	5	0,2 ml aus Ohrarterie	-	Serum I	(+ +)
12.02.81	15	5 ml aus Ohrarterie	0,2 ml AdFL (2,2 mg/ml) Subcutan in Rücken	Serum II	(+/-)
12.03.81	19	10 ml aus Ohrarterie	-	Serum III	(+)
19.03.81	20	150 ml (ausgeblutet)	-	Serum IV	(+ +)

Tab. 3-2: Immunisierung eines Kaninchens mit AdFL

werden. Im allgemeinen wurde ein etwa 1 cm hohes Stützgel gegossen, indem einige Milliliter der entgasten Laufgellösung entnommen und mit einem 3fachen Überschuß an Starter (DMAPN) zur raschen Polymerisation gebracht wurden. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Polymerisation mit einem Isopropanol-H_2O-Gemisch im Verhältnis 1:1 überschichtet. Nach Polymerisation des Sammelgels mußte das fertige Gel vor dem Auftragen der Proben mindestens 1 Stunde bei 80 Volt vorlaufen. Die Proben wurden mit

dem gleichen Volumen 2fach konzentrierten Probenpuffers versetzt, 5 Minuten lang gekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-200 Volt, bis das Bromphenolblau das Gelende (Pluspol) erreicht hatte (bei einem 25-cm-Gel ca. 20 Stunden bei 80 Volt).

Probenpuffer (2 x konzentriert): 0,6 % SDS; 20 % Glycerin; 0,03 % Bromphenolblau; 100 mM Tris pH 6,8; 1,4 M Mercaptoäthanol
Elektrophoresepuffer: 0,4 M Glycin; 50 mM Tris; 0,1 % SDS

Lösungen	Ausgangskonz.	Trenngel			Sammelgel		
		Endkonz.	30 ml	70 ml	Endkonz.	10 ml	30 ml
Acrylamid	98 %	14,9 %	11,8 ml	27,5 ml	5 %	3,4 ml	2,65 ml
N,N'-Methylenbisacrylamid	2 %	0,087 %	1,1 ml	3 ml	0,26 %	1,1 ml	2,65 ml
Tris-HCl pH 8,7	1,5 M	0,4 M	8,1 ml	19 ml	-	-	-
Tris-HCl pH 6,8	1M	-	-	-	0,125 M	1,25 ml	2,5 ml
H$_2$O	-	-	8,1 ml	19,4 ml	-	6 ml	12 ml
SDS	10 %	0,1 %	0,3 ml	0,7 ml	0,1 %	100 µl	200 µl
Ammoniumpersulfat	80 %	0,07 %	70 µl	165 µl	0,07 %	23 µl	46 µl
	5 Minuten entgasen						
DMAPN	Konz.	0,05 %	150 µl	330 µl	0,05 %	61 µl	122 µl

Tab. 3-3: Herstellen eines 15%igen Proteingels

3.3.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

- Coomassie-Blau Färbung

Die Proteingele wurden 2 Stunden in einer Färbelösung mit 0,2 % Coomassie-Blau und 50 % Trichloressigsäure (TCA) angefärbt. Die Entfärbung erfolgte unter wiederholtem Wechsel der Lösung in einem Gemisch aus 5 % Methanol und 7 % Essigsäure.

- Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde ähnlich wie bei Oakley (1980) und Merril (1980) beschrieben durchgeführt. Die Methode wurde jedoch vereinfacht und die Konzentration der Färbelösung an Silbernitrat halbiert. Die Empfindlichkeit erreichte die in der Literatur beschriebenen Werte (Sammons, 1981; Ochs, 1981). Ein 1,5 mm dickes

15%iges Polyacrylamid-Gel wurde 20 Minuten lang in 100 ml 5%igem Glutardialdehyd fixiert und viermal 10 Minuten mit H_2O bidest. gewässert. Die Anfärbung erfolgte in einer frisch angesetzten ammoniakalischen Silberlösung. Für 100 ml Lösung wurden zu 96 ml H_2O bidest. 1 ml NaOH (1 M) und 0,7 ml konzentrierter Ammoniak zugesetzt. Dann wurden 2ml 20%ige Silbernitrat-Lösung unter Rühren hinzugegeben. In dieser Lösung wurde das Gel 10-15 Minuten lang behandelt, dann zweimal 2 Minuten gewässert und in einer Entwicklerlösung aus 0,005 % Zitronensäure und 0,02 % Formaldehyd (200 ml Entwickler ensprechen 1 ml 1%iger Zitronensäure und 110 µl 35%igem Formaldehyd) bis zum Erscheinen der Proteinbanden entwickelt. Nach gründlichem Wässern (mindestens 30 Minuten) konnte das Gel fotografiert oder getrocknet werden. Überentwickelte Gele wurden mit Abschwächer (Tetenal-Abschwächer, Nr. 11171) vorsichtig gebleicht (irreversibel!). Während des Anfärbens nahmen die Gele deutlich an Größe zu. Dieser Effekt konnte durch ein Bad aus 90 % Methanol/2 % Eisessig rückgängig gemacht werden.

- Autoradiographie

^{35}S-markierte Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen (Laskey and Mills, 1977). Die Gele wurden unter Erwärmen am Wasserstrahlvakuum 2 Stunden lang getrocknet und in einer Kassette mit Verstärkerfolie (Kodak X-Omatik oder DuPont Cronex Quanta II) auf Kodak X-Omat Ar Röntgenfilm einen Tag bis mehrere Wochen lang exponiert.

3.3.4 Transfer von Proteinen aus Gelen auf Nitrozellulosefilter (Western Blotting)

Der Transfer der Proteine von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosefilter erfolgte elektrophoretisch (Elektro Blotting - Towbin 1979; Bittner, 1980; Symington, 1981). Das Proteingel (Größe: 13 x 15 cm) wurde zunächst bei dreimaligem Wechsel des Blottingpuffers (25 mM $NaPO_4$, pH 6,5; 1 mM EDTA) mindestens eine Stunde lang äquilibriert. Im selben Puffer wurden Whatman-3MM-Papier und NC-Filter durchfeuchtet. Der Elektroblot

wurde, wie in Abbildung 3-1 gezeigt, in einer Schale unter Puffer zusammengebaut, um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden. Die Elektrophorese erfolgte unter Pufferrezirkularisation 4 Stunden lang bei einer Stromstärke von 1 A. Danach wurde der Filter im Lyophilisator 5-10 Minuten lang getrocknet und anschließend trocken in einem Briefumschlag bei 4°C aufbewahrt.
Durch Anfärben des Blots mit Amidoschwarz (0,1 % in 45 % Methanol und 10 % Eisessig - 15 Minuten) und anschließendes Einfärben in 90 % Methanol und 2 % Eisessig (Schaffner, 1973) konnten alle übertragenen Proteine sichtbar gemacht werden.

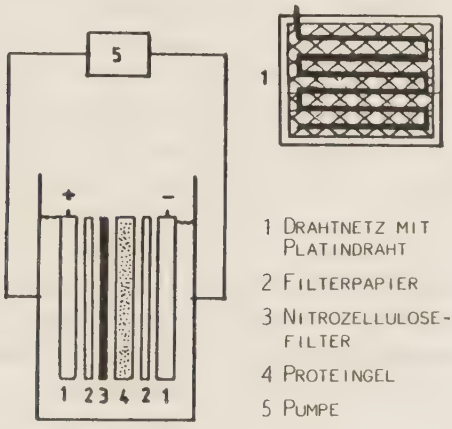


Abb. 3-1: Aufbau eines Elekroblots für den Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosefilter

3.3.5 Immunologischer Nachweis viraler Proteine auf Nitrozellulosefiltern

Die Markierung viraler Proteine mit spezifischen Antikörpern erfolgte im Prinzip so ähnlich wie bei der indirekten Immunfluoreszenz. Um nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel zusätzliche noch freie Proteinbindungsstellen des Filters

abzusättigen, wurde zunächst mit frisch angesetztem i-Prämix (i = Immunblot) mit Rinderserumalbumin 2 Stunden lang bei 42°C unter Schütteln vorhybridisiert. Der Filter wurde nacheinander zuerst mit dem viralen Antiserum aus Kaninchen, dann mit dem FITC-markierten, gegen Kaninchen-Antikörper gerichteten Antiserum je 2 Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Dazwischen wurde zweimal mit i-Mix I gewaschen. Die beiden Seren wurden 1:100 bis 1:200 in i-Mix verdünnt. Für 1 cm^2 Filterfläche wurden ca. 25 µl Serumlösung benötigt. Während der Behandlung waren die Filter in Plastiktüten eingeschweißt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, mußte man den Filter waschen. Dazu wurde er der Plastiktüte entnommen und in einer Schale zunächst einmal kurz mit Wasser gespült und dann für mindestens 15 Minuten in i-Mix II geschüttelt. Die Proteinbanden sind unter UV-Auflicht (254 nm) sichtbar. Für die Fotografie wurden ein Gelb- oder ein Grünfilter verwendet. Die Anfärbung blieb monatelang stabil, wenn man den Filter trocken unter Lichtabschluß bei 4°C aufbewahrte.

i-Prämix: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 % BSA
i-Mix I: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA;
0,25 % Gelatine; 0,05 % Triton-X-100
i-Mix II: 50 mM Tris-Hcl pH 7,4; 1 M NaCl; 5 mM EDTA;
0,25 % Gelatine; 0,4 % Sarcosyl

3.3.6 Immunpräzipitation viraler Proteine

Virales Hexon wurde weitgehend nach der Methode von Smith (1978) aus Rohextrakten infizierter Zellen gefällt.
Ein geeignetes Volumen Zellextrakt oder gereinigtes Virus wurde mit TS (mit 1,5 mM PMSF, 0,005 % Triton X 100) auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Die Suspension wurde mit 10 µl Kälberserum 1 Stunde lang bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurden 20 µl Staphylococcus aureus (Pansorbin, Biochem) zugegeben. Nach einer weiteren 20minütigen Inkubation wurde 2 Minuten lang in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Das Hexonprotein wurde aus dem Überstand auf die selbe Weise mit 5 µl Anti-Ad2-Hexon-Serum

oder Anti-AdFL-Serum präzipitiert. Allerdings wurde nur 10-15 Sekunden lang zentrifugiert, um den Niederschlag beim Waschen - einmal mit NET-LiCl und einmal mit NET - wieder suspendieren zu können. Für die Elektrophorese wurde der Niederschlag 5 Minuten lang mit 20 µl Proteinprobenpuffer (3.3.2) gekocht und aufgetragen.

NET-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05 % Triton X 100;
NET-LiCl-Puffer: NET-Puffer mit 0,5 M LiCl

3.4. Charakterisierung von RNA

3.4.1 Isolierung zytoplasmatischer RNA

Die Isolierung viraler RNA erfolgte ähnlich wie bei Jones und Shenk (1979) beschrieben. Es wurde eine Trennung zwischen zytoplasmatischer und Kern-RNA vorgenommen, ohne jedoch die mRNA von der Gesamt-RNA abzutrennen. Bei der Reinigung wurde von einer Kulturschale (24 x 24 cm) mit 5 x 10^7 AdFL-infizierten Zellen ausgegangen. Das Medium wurde abgegossen, die Zellen wurden mehrmals mit eiskaltem TS gewaschen und bei -80°C für maximal 2 Tage eingefroren oder sofort mit 3 ml Lysispuffer (10 mM Tris pH 7,8; 1,5 mM $MgCl_2$; 150 mM NaCl; 0,6 % Triton-X100) bedeckt. Nach einer Einwirkungsdauer von 10 Minuten bei 4°C wurden die Zellen mit einem sterilen Gummiplättchen abgeschabt, in ein steriles Plastikröhrchen übertragen und dreimal mit einem Rüttler kräftig aufgewirbelt. Um die Kern- von der Zytoplasmafraktion zu trennen, wurde 10 Minuten lang in einer Tischzentrifuge bei 2500 rpm im Kaltraum zentrifugiert. Daraufhin wurden die Kerne (Niederschlag) zweimal mit isotonischem Puffer (10 mM Tris pH 7,8; 1,5 mM $MgCl_2$; 150 mM NaCl) gewaschen und zunächst eingefroren. Das

Zytoplasma (Überstand) wurde mit 1/10 Volumen 1 M Tris-Puffer pH 9 versetzt, zweimal mit je 1 Volumen Phenol extrahiert (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 500:100:1) und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) rückextrahiert. Die RNA-Lösung wurde dann in Eppendorfgefäßen portioniert,mit Äthanol gefällt und bei -80°C aufbewahrt. Alle weiteren Schritte der Alkoholfällung erfolgten erst dann, wenn die Probe auf einem Gel aufgetragen werden sollte.
Die Kerne wurden zunächst mit 0,5 µl Kernpuffer (50 mM Natriumacetat pH 5,2; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA) suspendiert, durch Zugabe von 1/20 Volumen 10%igem SDS lysiert und zweimal phenolisiert (Phenol gesättigt mit 50 mM Natriumacetat pH 5,2). Die Rückextraktion und die Fällung erfolgten in gleicher Weise wie bei der Zytoplasmafraktion. Nach der Fällung wurde der Niederschlag (vor allem Kern-RNA und DNA) in 0,3 ml einer Lösung aus 10 mM Tris pH 7,4 und 10 mM $MgCl_2$ aufgenommen und 2 Stunden lang bei 37°C mit 50 µg/ml DNase I inkubiert. Nach erneuter Phenolisierung wurde die Kern-RNA, wie vorher beschrieben, portioniert gefällt.

3.4.2 Auftrennung von RNA auf Agarosegelen

Formaldehyd- und Glyoxalgele eignen sich gleichermaßen zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA-Molekülen. Während das Formaldehydgel selbst denaturierend ist, wird bei Verwendung eines Glyoxalgels die RNA nur durch vorherige Glyoxylierung denaturiert. Das Gel selbst ist nicht denaturierend. Um das während der Elektrophorese entstehende pH-Gefälle im Laufpuffer auszugleichen, wurde durch Umpumpen des Puffers aus beiden Kammern für einen ständigen Austausch gesorgt. Dies geschah in speziell dafür angefertigten Flachgel- oder Senkrechtgel-Apparaturen. Abbildung 3-2 zeigt die Funktionsweise einer solchen Flachgel-Apparatur. Der Puffer wurde von einer Elektrodenkammer in die andere gepumpt und konnte von dort in einem Überlauf zurückfließen. In entsprechender Weise funktionierte die Senkrecht-Apparatur, in der der Puffer von

der unteren Kammer in die obere gepumpt wurde, die durch einen Überlauf wieder mit der unteren verbunden war. Der Kurzschlußstrom war dabei minimal und hatte keine negativen Auswirkungen auf den Gellauf.

- Formaldehydgele

Für die Herstellung eines 1-1,5%igen Agarose-1,1-M-Formaldehydgels wurde die Agarose in einem Gelpuffer (20 mM NaH_2PO_4, pH 7; 1 mM EDTA; 92 % des Endvolumens) gekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 70°C mit 8 % des Endvolumens Formaldehyd (35%ig) vermischt. Das noch flüssige Gel reizt die Schleimhäute sehr stark und wurde deshalb unter dem Abzug gegossen. Die RNA-Proben, gelöst in H_2O, wurden mit dem dreifachen Volumen "Heating"-Puffer versetzt (10 mM NaH_2PO_4 pH 7, 50 % Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 0,5 mM EDTA und 5 Minuten bei 60°C erhitzt (Lehrach et al., 1977). Nach dem Mischen mit 1/5 Volumen Probenpuffer (0,5 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 25 % Glyzerin, 25 mM EDTA) wurden die Proben aufgetragen und bei 40 Volt (3 mm dicke Senkrechtgele) oder 80-100 Volt (bei Flachgelen) unter Umpumpen des Elektrodenpuffers (20 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt.

- Glyoxalgele

Die 1-1,5%igen Agarosegele wurden in dem selben Puffer (20 mM NaH_2PO_4; 1 mM EDTA) hergestellt, jedoch ohne Formaldehyd. Die Glyoxylierung der RNA vor der Gelelektrophorese erfolgte wie bei Maniatis (1982) beschrieben. Zur Denaturierung wurden 3,7 µl RNA, gelöst in H_2O, mit 2,7 µl Glyoxal (gereinigt über Ionenaustauscher), 8 µl DMSO und 1,6 µl 0,1 M NaH_2PO_4 (pH 7) versetzt und eine Stunde bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurden 4 µl RNA-Probenpuffer (50 % Glyzerin; 0,01 M NaH_2PO_4 pH 7; 0,4 % Bromphenolblau) zugegeben. Während der Elektrophorese wurde der Elektrodenpuffer umgepumpt. Alle verwendeten Losungen, auch der Elektrodenpuffer wurden autoklaviert. Glyoxalgele ebenso wie Formaldehydgele wurden mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) oder mit Acridin-Orange (20 µg/ml) im Gelpuffer angefärbt und im selben Puffer entfärbt.

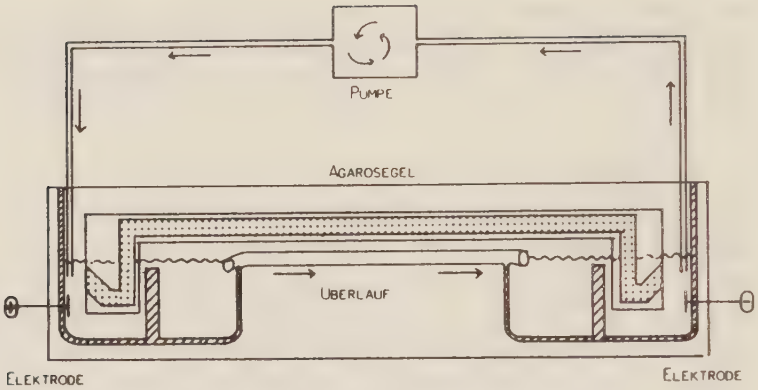


Abb. 3-2: Flachgelapparatur mit Pufferrezirkularisation zur Auftrennung von RNA

3.4.3 Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung mit DNA-Fragmenten (Northern Blotting)

Die Bindung von RNA an Nitrozellulosefilter und Hybridisierung der Blots erfolgte nach dem selben Prinzip wie für DNA beschrieben (siehe 3.6.4 und 3.6.5). Die Gele wurden jedoch vor dem Transfer nicht denaturiert und im allgemeinen auch nicht angefärbt. Außerdem wurde immer naß über einen Zeitraum von 1 bis 3 Tagen geblottet. Der Prähybridisierungsmix hatte eine etwas andere Zusammensetzung (50 % Formamid; 5 x SSPE, 5 x Denhardt's, 50 mM Pipes, 400 µg/ml RNA); für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA Probe wurde der gleiche Hybridisierungsmix verwendet wie für die Southernblot-Technik beschrieben. Ein bereits hybridisierter Blot konnte durch Waschen für eine erneute Hybridisierung vorbereitet werden. Dazu wurde der Filter 1 Stunde bei 90°C in einem Waschpuffer inkubiert (Thomas, 1980; modifiziert nach Lipp, 1981) Nach diesem Waschvorgang enthielt der Filter keine meßbare Radioaktivität mehr. Die zweite Hybridisierung wurde wie vorher beschrieben durchgeführt.

Waschpuffer: 50 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA, 1 x Denhardt's, 0,5 % Natriumpyrophosphat.

3.5 Enzymatische Reaktionen an freier DNA

3.5.1 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Enzympuffer	Lösung	Konzentration im Ansatz	Konzentration im 5xPuffer	Herstellen von 5ml 5xPuffer	Restriktions-enzyme	Temperatur
5xKpn	Tris pH7,4 NaCl $MgCl_2$ MeEtÖH Triton H_2O	6mM 10mM 6mM 6mM 0,05% -	30mM 50mM 30mM 30mM 0,25% -	150µl(1M) 50µl(5M) 150µl(1M) 11µl(konz) 125µl(10%) 4,5ml	Kpn I Bal I Xor II	37°C
5xPst	Tris pH7,4 NaCl $MgCl_2$ MeEtÖH Triton H_2O	6mM 50mM 6mM 6mM 0,05% -	30mM 250mM 30mM 30mM 0,25% -	150µl(1M) 250µl(5M) 150µl(1M) 11µl(konz) 125µl(10%) 4,3ml	Pst I,Acc I Bgl I,Bgl II Bst EII Hind III Hinc II Sph I	37°C
5xXho	Tris pH8 NaCl $MgCl_2$ MeEtÖH Triton H_2O	6mM 150mM 6mM 6mM 0,05% -	30mM 750mM 30mM 30mM 0,25% -	150µl(1M) 750µl(1M) 150µl(1M) 11µl(konz) 125µl(10%) 3,8ml	Xho I Bam HI Sal I Nco I Xba I	37°C
5xEco	Tris pH7,4 NaCl $MgCl_2$ Triton H_2O	100mM 50mM 6mM 0,05% -	500mM 250mM 30mM 0,25% -	2,5ml(1M) 250µl(5M) 150µl(1M) 125µl(10%) 2ml	Eco RI	37°C
5xSma	Tris pH8 KCl $MgCl_2$ MeEtÖH H_2O	6mM 20mM 6mM 6mM -	30mM 100mM 30mM 30mM -	150µl(1M) 500µl(1M) 150µl(1M) 11µl(konz) 4,35ml	Sma I Hpa I	30°C 37°C

Tab. 3-4: Versuchsbedingungen für Restriktionsverdauungen

Virale oder Plasmid-DNA wurde mit zweifach destilliertem Wasser auf eine Konzentration von maximal 200 µg/ml verdünnt und mit einem fünffach konzentrierten Puffer für die Restriktionsverdauung eingestellt. Die optimalen Salzbedingungen wurden den Herstellerkatalogen entnommen, teilweise jedoch geringfügig abgeändert, um mit wenigen standardisierten Puffern auszukommen (siehe Tabelle 3-4). Darüber hinaus wurde Triton-X-100 in einer Konzentration von 0,05 % hinzugefügt. Die Puffer enthielten dagegen kein Rinderserumalbumin. Je nach DNA-Menge wurden 1 bis 10 Einheiten Enzym eingesetzt und 30 Minuten bis mehrere Stunden lang oder auch über Nacht bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Daraufhin wurde entweder die Reaktion durch Phenolisierung unterbrochen, oder die Probe wurde durch Zugabe von 1/4 bis 1/2 Volumen Stoppuffer für die Gelelektrophorese vorbereitet.

SDS-Stoppuffer: 10 mM Tris pH 8; 50 mM EDTA; 1 % SDS; 0,1 mg/ml Bromphenolblau; 25 µg/ml XC; 30 % Glycerin

Sucrose-Stoppuffer: 50 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 50 µg/ml Bromphenolblau; 42,5 % Sucrose

3.5.2 Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase

Die Abspaltung der Phosphatreste an den 5'-Enden von DNA-Restriktionsfragmenten war nötig, um zu verhindern, daß der linearisierte Vektor während der Ligase-Reaktion rezyklisiert, oder um die Enden für die Sequenzierung mit T4-Kinase markierbar zu machen.

Die DNA-Fragmente wurden ohne Vorbehandlung noch im Restriktionspuffer mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dazu wurde dem Ansatz 1/20 Volumen eines 20fach konzentrierten Phosphatasepuffers (20 x RAP-Puffer: 0,8 M Tris pH 8, 100 mM $MgCl_2$; 10 mM $ZnCl_2$) hinzugefügt, um ihn so auf die optimalen Salzbedingungen einzustellen. Die Reaktion erfolgte mit 1 bis 5 Enzymeinheiten 30 Minuten lang bei 37°C, wobei der Ansatz zum

wiederholten Male leicht geschüttelt wurde. Die alkalische Phosphatase (aus Rinderdarm = RAP) wurde in RAP-Puffer gelöst (Lyophilisat) oder gegen diesen Puffer dialysiert (3,2 M Ammoniumsulfat-Suspension) und auf eine Endkonzentration von 1 Einheit/µl eingestellt. Das Enzym wurde in dieser Lösung im Kühlschrank aufbewahrt und behielt mehrere Monate lang seine Aktivität. Nachdem die Abspaltung beendet war, wurde der Ansatz sofort auf ein Gel aufgetragen oder mit TE auf ein Mindestvolumen von 200 µl gebracht und phenolisiert. Obwohl alkalische Phosphatase aus Rinderdarm durch Erhitzen auf 68°C inaktiviert werden kann, wurde die Phenolisierung bevorzugt, um eine Störung der nachfolgenden Reaktionen mit Sicherheit auszuschließen. Dazu wurde der Ansatz mit je 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol zweimal extrahiert und zwei- bis dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abblasen des Äthers wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen Äthanol entweder bei -20°C über Nacht oder 10 Minuten bei -70°C in einem Äthanol-Trockeneisbad gefällt.

3.5.3 ^{32}P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotid-Kinase

Für die radioaktive Markierung wurde nur Plasmid-DNA verwendet, die über eine Molekularsieb-Säule nachgereinigt worden war (siehe 3.9.3). Da in diesen Versuchen ausschließlich vorstehende 5'-Enden markiert werden sollten, konnte auf die Denaturierung der DNA verzichtet und im pH-Optimum des Enzyms gearbeitet werden. Die nach der Phosphatasereaktion gefällte DNA (1-5 µg; maximal 30 pmol 5'-Enden) wurde in 27 µl H_2O gelöst und mit 3 µl 10fach konzentriertem Kinasepuffer (500 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM Dithiothreitol; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA) auf die Salzbedingungen eingestellt, die für die Reaktion am günstigsten waren (Richardson, 1975; Lillehaug, 1975). Der fertige Ansatz wurde in ein neues Eppendorfgefäß mit 50-100 µCi lyophilisiertem γ-^{32}P-ATP (3000 Ci/mmol - mindestens 30 pmol) übertragen.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1-5 Einheiten Kinase

gestartet. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der gesamte Ansatz mit TE auf 200 µl ergänzt und über eine Pipettenspitze mit Sephadex G 50 in einer Wifug Tischzentrifuge bei Stellung I zentrifugiert (vgl. 3.6.4). Mindestens 50 % der Gesamtaktivität des Eluats waren TCA-fällbar, d.h. die Abtrennung des nicht eingebauten γ-^{32}P ATP (über 99 % der Gesamtaktivität) war wesentlich besser, als sie durch zweimalige Äthanolfällung erreicht werden konnte (ca. 25 % der Gesamtaktivität bleiben nach Äthanolfällung im Ansatz). Das Eluat wurde auf eine Konzentration von 0,3 M Natriumacetat gebracht, mit 3 Volumen Äthanol gefällt und mit geeigneten Restriktionsenzymen nachgeschnitten.

3.5.4 Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Für die Klonierung von AdFL-DNA mußten Restriktionsfragmente mit geeigneten Vektoren vor der Transformation der Bakterien kovalent verknüpft werden (Dugaiczyk et al., 1975; Graf, 1979). Einige µg Restriktionsfragmente und äquimolare Vektormengen wurden in 30-50 µl Ligasepuffer (20 mM Tris; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM DTE; 0,5 mM ATP pH 7,6) gelöst. Die Reaktion erfolgte mit 5 bis 10 Einheiten Enzym zunächst 30 Minuten lang bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 12°C im Kaltraum. Um die Volständigkeit der Ligierung zu überprüfen, wurde, sofern dies die DNA-Mengen zuließen, vor und nach der Reaktion ein Teil der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.6 Charakterisierung von DNA

3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung größerer DNA-Fragmente (ab 200 bp) für analytische oder präparative Zwecke erfolgte auf 0,6-1,5%igen Agarosegelen

unterschiedlicher Dicke (3-10 mm). Je nach Situation wurden Vertikalgele oder Horizontalgele bevorzugt. Vertikalgele benötigen weniger Material und erlauben das Auftragen großer Volumina. Horizontalgele ermöglichen auch bei geringen Agarosekonzentrationen eine Auftrennung über weite Laufstrecken (bis ca. 30 cm) und können problemlos schon während des Laufs unter UV-Licht kontrolliert werden. Bei Flachgelen ist darauf zu achten, daß der SDS-haltige Probenpuffer (vgl. 3.5.1) nicht verwendet werden darf, da durch die Veränderung der Oberflächenspannung die Proben aus den Auftragstaschen herausgezogen werden können.
Zur Herstellung eines 0,6-1,5%igen Gels wurde die Agarose in TA-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) eingewogen, im Mikrowellenherd aufgekocht und vor dem Gießen im Wasserbad auf 80°C für Senkrechtgele oder 60°C für Horizontalgele abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte üblicherweise mit 40 Volt und 25-30 mA Gleichspannung bei Senkrechtgelen (15 cm hoch, 14 cm breit, 3mm dick) oder mit 70-80 Volt und 35 mA bei Flachgelen (30 cm lang, 15 cm breit, 6-10 mm dick). Nach dem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid in einer Konzentration von 2 µg/ml in TA-Puffer angefärbt. Manchmal wurde das Ethidiumbromid auch in einer Konzentration von 0,3 µg/ml der noch flüssigen Agarose zugesetzt. Das erwies sich jedoch bei sehr genauen Analysen als unzweckmäßig, da Ethidiumbromid die Laufeigenschaften der DNA-Moleküle vor allem in Proben, die mit tRNA verunreinigt sind, beeinflussen kann. Die angefärbten Gele wurden auf einer Chroma-41 UV-Lampe (254 nm) mit einer Polaroidkamera mit Orangefilter auf Polaroid-Film (Typ 107) fotografiert (Blende 11; 10-60 Sekunden).

3.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sehr kleine DNA-Fragmente wurden auf 5-8%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Für die Herstellung eines 6%igen Gels (80 ml; 25 cm lang, 14 cm breit, 1,5 mm dick) wurde eine Mischung aus 33 ml

bidestilliertem Wasser, 23 ml 38%igem Acrylamid, 15 ml 2%igem N,N'-Methylenbisacrylamid, 8 ml 10fach-TEB-Puffer und 0,2 ml 30%igem Ammoniumperoxodisulfat etwa 5 Minuten lang entgast. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,6 ml DMAPN vor dem Gießen gestartet. Um das Ammoniumperoxodisulfat vor dem Auftragen der Proben zu entfernen, wurde etwa 1/2 Stunde lang eine Spannung von 80 Volt angelegt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei der gleichen Spannung für 10 bis 14 Stunden. Als Elektrodenpuffer wurde TEB verwendet (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,2).

3.6.3 Gelelektrophorese auf Mischgelen

Für die unter 4.3 beschriebene Auftrennung radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurden zylindrische Agarose-Polyacrylamid-Mischgele verwendet. Diese Gele können im Gegensatz zu reinen Agarose- oder Polyacrylamid-Gelen mit einem Spezialgerät, das im Prinzip wie ein Eierschneider funktioniert, in 0,9 mm dicke Scheiben zerschnitten werden.

Die Herstellung erfolgte ähnlich wie bei Peacock und Dingman (1968) beschrieben. Für ein 20-ml-Gel wurden 5 ml H_2O, 1 ml Acrylamid (38 %), 1 ml Bisacrylamid, 2 ml 10fach-TEB-Puffer, 120 µl DMAPN und 1 ml Sarcosyl (10 %) nacheinander zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde mit 10 ml frisch aufgekochter 1,6%iger Agarose und 30 µl 33%igem Ammoniumperoxodisulfat gemischt und in Glasröhrchen gegossen. Nach der Polymerisation wurde die Auftragsfläche mit einer Rasierklinge geradegeschnitten. Vorlauf und Elektrophorese erfolgten bei 50 Volt. Der Laufpuffer enthielt TEB-Puffer und 0,5 % Sarcosyl. Zur Auswertung wurde das Gel in Scheibchen zerschnitten, die einzeln in 0,6 ml 0,1%igem SDS bei 37°C durch Schütteln eluiert wurden. Das Eluat wurde auf Whatman GF/A-Glasfiltern getrocknet. Die Radioaktivität jeder Probe wurde nach Zugabe von Szintillatorflüssigkeit bestimmt.

3.6.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte ähnlich wie bei Smith (1980) beschrieben. Das Gelstückchen mit dem gewünschten Fragment wurde unter UV-Licht möglichst knapp aus dem Gel ausgeschnitten, durch eine 1-ml-Spritze (Terumo), deren Öffnung mit Hilfe eines Bunsenbrenners verengt worden war, in ein Eppendorfgefäß gepreßt und mit sterilem Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,4; 5 mM EDTA 0,2 % SDS) im Volumenverhältnis 1 : 1 vermischt. Das Fragment wurde über Nacht bei Raumtemperatur oder durch zweimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (37°C) eluiert. Um die Agarose und andere Verunreinigungen abzutrennen, wurde das Gemisch durch zwei Pipettenspitzen mit Glaswolle und Sephadex G 50 in einer Wifug-Tischzentrifuge bei geringster Drehzahl (ca. 500 rpm) zentrifugiert. Die beiden Pipettenspitzen waren ineinander gesteckt. Die obere enthielt nur Glaswolle und die Gelstücke und sollte die groben Bruchstücke abtrennen; die zweite Spitze enthielt das Sephadex-G50-Molekularsieb und sollte die DNA-Lösung weiter reinigen. Das Eluat wurde mit dem gleichen Volumen TE-gesättigten Phenols zweimal extrahiert und mit Äther ausgeschüttelt und sofort oder nach Dialyse mit Äthanol gefällt.
Nach Versuchen mit radioaktiven Fragmenten lagen die Ausbeuten auch für große Bruchstücke (15 kbp) bei 75-90 %. Auf diese Weise gereinigte Fragmente konnten sowohl in die Sequenzierungsreaktionen als auch in enzymatische Reaktionen (Restriktionsverdauung, Ligasereaktion) mit Erfolg eingesetzt werden.

3.6.5 Transfer einer DNA von Agarosegelen auf Nitrozellulose-Filter (Southern Blotting)

DNA-Fragmente, die in Agarosegelen aufgetrennt worden waren, wurden für die nachfolgenden Hybridisierungsexperimente auf Nitrozellulosefilter übertragen (Southern; 1975, 1980). Um die DNA zu denaturieren, wurde das Gel zunächst 15 Minuten lang in 1,5 M

NaCl, 0,5 M NaOH geschwenkt. Zur Neutralisation wurde das gleiche Volumen 1,5 M NaCl, 0,45 M HCl zugegeben. Nach 5 Minuten wurde die Lösung durch eine andere (1,5 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8) ersetzt. Nach weiteren 15 Minuten Schwenken war das Gel für den Transfer im sogenannten Naßblot- oder im Trockenblotverfahren bereit. Beim Naßblot wird die DNA aus dem Gel eluiert, indem 20 X SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7) durchgesaugt wird (Southern, 1975). Beim Trockenblot steht für die Elution nur die im Gel selbst enthaltene Flüssigkeit zur Verfügung. Das zweite Verfahren ist deshalb weniger effizient und wurde nur angewandt, wenn DNA in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Vorteil der Trocken-Methode ist, daß im Sandwich-Verfahren zwei identische Abdrücke gewonnen werden können (Smith and Summers, 1980). Der Aufbau erfolgte wie in Abbildung 3-3 gezeigt.

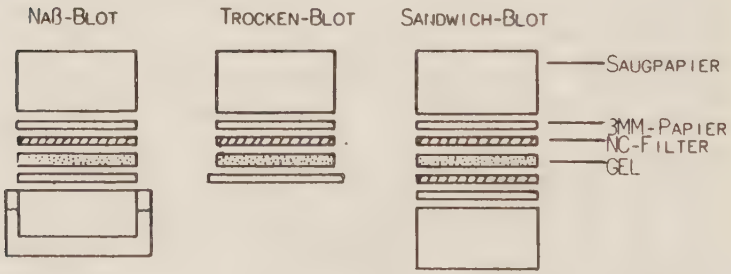


Abb. 3-3: Transferverfahren

Zunächst wurde das Nitrozelluloseblatt mit einem schwarzen Filzstift (edding 3000) beschriftet, auf einer Wasseroberfläche benetzt und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Die Filterpapierblätter wurden ebenfalls in Wasser oder 20 X SSC gelegt. Als Saugpapier dienten Papierhandtücher oder Zeitungen. Nach dem Transfer (über Nacht) wurde der Nitrozellulosefilter kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und 2 Stunden lang bei 80°C gebacken. Die fertigen Filter wurden bis zur Hybridisierung in Kuverts aufbewahrt.

3.6.6 Radioaktive Markierung von DNA durch Nicktranslation

Für die Hybridisierung an Southern(DNA)- oder Northern(RNA)-Blots wurden Virus-DNA oder klonierte DNA-Fragmente durch Nicktranslation radioaktiv markiert (Kelly et al., 1970; Rigby et al., 1977). Den jeweiligen Erfordernissen entsprechend wurden 30 bis 100 µCi eines in α-Stellung markierten ^{32}P-Nukleotids (meist α^{32}P-dCTP; 3000 Ci/mmol; Amersham) zusammen mit je 7 µl der drei anderen unmarkierten Desoxynukleotide (meist dGTP, dATP, dCTP; je 10 µM) lyophilisiert. Für die Reaktion wurde ca. 1 µg DNA mit 2 µl Tris/$MgCl_2$ (15 µl 1 M Tris pH 7,4; 5 µl $MgCl_2$) versetzt und mit bidestilliertem Wasser auf 25 µl ergänzt. In diesem Ansatz wurden die getrockneten Nukleotide aufgelöst. Mit 2 µl hochverdünnter DNase I (100 ng/ml) wurden die nötigen Einzelstrangbrüche in der DNA erzeugt (1 Minute bei Raumtemperatur). Der Einbau der Nukleotide erfolgte nach Zusetzen von 1-2 µl DNA Polymerase I (ca. 1 Enzymeinheit) aus E.coli (Boehringer Mannheim Nr. 104485) während einer zweistündigen Inkubation bei 15°C. Die Reaktion wurde mit 200 µl Stoppuffer (10 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA) unterbrochen. Nicht eingebaute Nukleotide wurden abgetrennt, indem der Ansatz durch eine mit Sephadex G 50 gefüllte Eppendorfspitze zentrifugiert wurde (vgl. 3.5.3, 3.6.4). Das Eluat bestand zu mindestens 50 % aus TCA-fällbarer, also in DNA eingebauter Radioaktivität. Die spezifische Aktivität lag bei $5x10^7$-10^8 cpm/µg DNA (in 100 µCi Ansätzen).

3.6.7 DNA/DNA-Hybridisierung nach Southern

Der Nitrozellulosefilter mit der gebundenen einzelsträngigen DNA wurde kurz mit Wasser benetzt, in eine Plastiktüte eingeschweißt und nacheinander 4-12 Stunden lang mit Prähybridisierungsmix und ca. 12 Stunden lang mit hitzedenaturiertem (5 Minuten auf 100°C erhitzt, dann auf Eis abgeschreckt) Hybridisierungsmix im Schüttelwasserbad bei 42°C inkubiert. Danach wurde er bei

Raumtemperatur 2 x 15 Minuten in 2 x SSPE / 0,1 % SDS und 2 x 15 Minuten in 0,1 x SSPE / 0,1 % SDS gewaschen. Schließlich wurde der Filter im Lyophilisator getrocknet und durch Autoradiographie (vgl.3.3.3) ausgewertet.

20 x SSPE:
3,6 M NaCl; 0,2 M NaH_2PO_4, pH 7,7; 20 mM EDTA
1 x Denhardt's:
0,02 % BSA; 0,02 % Ficoll; 0,02 % Polyvinylpyrrolidon
Prähybridisierungsmix:
50 % Formamid; 5 x SSPE; 5 x Denhardt's; 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
Hybridisierungsmix:
50 % Formamid; 5 x SSPE; 1 x Denhardt's; 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
10 % Dextransulfat; radioaktiv markierte DNA-Probe

3.6.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte im wesentlichen nach den Protokollen aus dem Labor von Maxam und Gilbert (Arbeitsprotokoll; Maxam und Gilbert, 1977; 1980). Deshalb sollen hier nur einige Änderungen genauer beschrieben werden:

- Kinasereaktion (vgl. 3.5.3): Das nicht eingebaute γ-^{32}P-ATP wurde praktisch quantitativ durch Zentrifugation über eine mit Sephadex G 50 gefüllte Pipettenspitze abgetrennt.
- Magnesium- und evtl. auch andere Ionen können laut Maxam/Gilbert-Protokoll unlösliche Komplexe mit Hydrazin bilden. In früheren Sequenzierungen traten nach der Hydrazinreaktion im (C)- und (C+T)-Ansatz oft Hydrazinperlen oder voluminöse Niederschläge auf, die sich in den weiteren Reaktionen nicht auflösten, diese aber störten und zu hohen Verlusten führten. Nach Verwendung eines anderen Elutionspuffers (10 mM Tris pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS) für die Isolierung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente aus Gelen (vgl. 3.6.2) trat dieses Problem nicht mehr auf (Maxam/Gilbert-Elutionspuffer enthält 500 mM

Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat).

- Die (G+A)-Reaktion wurde nicht 70 Minuten lang bei 20°C, sondern 15 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, daß alle Proben etwa gleichzeitig und ohne Wartezeit weiter verarbeitet werden konnten.
- Als Ergänzung zu den vier Standardreaktionen (G), (G+A), (C+T) und (C) wurde immer auch die (A>C)-Reaktion, ebenfalls nach dem Maxam/Gilbert-Protokoll durchgeführt. Sie lieferte bei der Auswertung der Autoradiographie von Sequenzgelen oft sehr wertvolle zusätzliche Informationen vor allem dann, wenn eine der vier Standardreaktionen nicht zufriedenstellend abgelaufen war.
- Wegen des hohen Dampfdrucks bei 90°C in der Piperidinreaktion besteht die Gefahr, einen Teil der Probe zu verlieren. Deshalb wurden die Eppendorfgefäße während dieser Reaktion in einer verschraubbaren Metallschiene mit Bohrungen für 10 Gefäße so fixiert, daß die Deckel der Gefäße nicht aufspringen konnten.
- Die Sequenzgele wurden während der Elektrophorese über die Kühlschlange der Gelapparatur mit Hilfe eines Wasserbades konstant auf 50°C temperiert. Die Gele konnten dadurch auch mit niedrigeren Spannungen gefahren werden, ohne Unregelmäßigkeiten im Lauf der Fragmente durch Ausbildung von Sekundärstrukturen befürchten zu müssen.

3.7 Klonieren viraler DNA-Fragmente in E.coli

3.7.1 Vorbereitung des Vektors

Der Vektor (pBR322, pBR327, pUC7, pUC8) wurde mit dem- oder denselben Restriktionsenzymen geschnitten wie die DNA, die kloniert werden sollte. Um den erneuten Ringschluß ohne Einbau von Fremd-DNA zu unterbinden, wurde der Vektor meistens mit alkalischer Phosphatase (siehe 3.5.2) behandelt und phenolisiert.

Anschließend wurde er mit dem viralen Restriktionsfragment ligiert (3.5.4). In einigen Fällen erfolgte nach dem Schneiden eine Reinigung des geschnittenen Vektors durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließende Elution. Sofern der Vektor (pUC8) mit zwei Enzymen geschnitten wurde, konnte das freiwerdende kleine Zwischenfragment durch Säulenchromatographie über Sephadex G 50 abgetrennt werden.

3.7.2 Vorbereiten der Restriktionsfragmente

Wenn ein Fragmentgemisch kloniert werden sollte, mußte das Restriktionsenzym desaktiviert werden. Deshalb wurde die DNA nach Restriktionsverdauung zweimal mit Phenol extrahiert, zweimal mit Äther ausgeschüttelt und mit Äthanol gefällt. Meistens wurden jedoch aus Agarosegelen gereinigte Fragmente kloniert (vgl.3.6.4). Die Enden der beiden terminalen AdFL-Fragmente mußten durch Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen dem Serinrest des terminalen Proteins und dem Desoxycytidinrest der DNA der Ligase zugänglich gemacht werden. Dazu wurde das Fragmentgemisch nach PstI-Verdauung 70 Minuten bei 37°C in 0,1 M NaOH inkubiert und anschließend mit der äquimolaren Menge HCl neutralisiert (Carusi, 1977). Eine zweite Möglichkeit bot die Spaltung mit Piperidin (Stillman et al., 1982). Das Fragmentgemisch wurde in einem Ansatz mit 100 µl auf eine Konzentration von 0,5 M Piperidin gebracht. Daraufhin wurde der Ansatz eine Stunde lang bei 37°C inkubiert, dann lyophilisiert, zweimal in Wasser gelöst und erneut lyophilisiert. Die denaturierten DNA-Stränge wurden 2 Stunden lang bei 68°C in TE-Puffer reassoziiert. Die Reinigung der Endfragmente erfolgte nach Gelelektrophorese aus Agarosegelen.

3.8 Bakterienzucht

3.8.1 Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten

Transformierte Bakterien wurden auf L-Broth Vollmedium-Agarplatten (10 cm, Nunc) mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Herstellung des Mediums wurden 5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl und 7,5 g Agar in 500 ml bidestilliertem Wasser autoklaviert, auf 50-60°C abgekühlt und mit 0,5 ml Ampicillin (50 mg/ml) oder Tetracyclin (12,5 mg/ml) auf eine Konzentration von 50 µg/ml (Amp) bzw. 12,5 µg/ml (Tet) gebracht. Beim Klonieren in pUC-Vektoren wurden dem Agar vor dem Gießen der Platten außerdem 0,5 ml einer X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid; Sigma B-4252), gelöst in Dimethyl-Formamid (20 mg/ml), zugesetzt. Die Stammlösungen der Antibiotika und X-Gal wurden bei -20°C aufbewahrt. Mit 500 ml Agar konnten 20-25 Platten gegossen werden. Sie sind im Kaltraum mehrere Wochen lagerfähig.

3.8.2 Aufzucht von Bakterien in Flüssigkultur

L-Broth Flüssigmedium wurde wie in 3.8.1 beschrieben hergestellt (jedoch ohne Agar) und bei Bedarf mit einem Antibiotikum versetzt. Sollte ein Bakterienstamm in größeren Mengen (0,1-1 l) angezogen werden, wurde das vorgewärmte Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 1-5 ml einer 5-ml-Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6-0,8, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm, wurden transformierte Bakterienkulturen mit Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zu einer erhöhten Plasmidvermehrung angeregt. Nach der Stimulation wurde die Kultur über Nacht weitergeschuttelt und dann in einem GSA-Rotor in einer Sorvall-SS3-Zentrifuge bei 4°C abzentrifugiert.

3.8.3 Herstellen transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden ähnlich wie bei Mandel und Higa (1970) und Morrison (1977, 1979) beschrieben hergestellt. Antibiotikafreies, vorgewärmtes Bakterienmedium (L-Broth, 100 ml) wurde mit 1 ml einer Übernachtkultur (Stamm HB 101 für pBR-Transformation oder JM 83 für pUC-Transformation) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4-0,6 bei 37°C herangezogen (dauerte etwa 2 Stunden). Nur Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase eignen sich für die spätere Transformation. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, das Sediment wurde in 20 ml eisgekühltem Kalziumpuffer (1 mM Tris pH 7,8; 50 mM $CaCl_2$) resuspendiert, 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und in einer Tischzentrifuge (Labofuge; Heraeus/Christ) 10 Minuten lang bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml Kalziumpuffer mit 15 % Glycerin aufgenommen und in 0,2-ml-Portionen bei -80°C eingefroren; bei -20°C eingefrorene kompetente Zellen verloren nach wenigen Tagen ihre Transformierbarkeit (Morrison, 1977, 1979).

3.8.4 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien (0,2 ml) wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurden meist ca. 100 ng bis zu 1 µg ligierte DNA (5-30 µl) und 100 µl Transformationspuffer (20 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA, 20 mM NaCl) hinzupipettiert. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis folgten ein 2 Minuten andauernder Hitzeschock bei 42°C und Abkühlung auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten. Nach Zugabe von 1,7 ml L-Broth wurde der Ansatz 1-2 Stunden lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert (Cohen et al., 1972; Lederberg und Cohen, 1974). Je nachdem, wie hohe Transformantenzahlen zu erwarten waren, wurden 10 µl bis 0,5 ml der Bakterienlösung auf Selektionsmedium plattiert. Manchmal wurden die transformierten Bakterien auch ohne größere Verluste 1-2 Tage lang bei 4°C aufbewahrt und erst dann ausgestrichen.

3.8.5 Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Wenn Bakterienstämme für längere Zeit aufbewahrt werden sollten, wurden Übernachtkulturen in Flüssigmedium mit 15 % Glycerin bei -20 oder -80°C eingefroren. Für kürzere Aufbewahrungszeiten von bis zu 6 Monaten wurden Agarplatten mit den Bakterienstämmen zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm umwickelt und bei 4°C aufbewahrt.

3.9 Identifizierung rekombinanter Plasmide

3.9.1 Schnellmethoden zur Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden

- Aufschluß mit Triton X 100

5-ml-Übernachtschüttelkulturen (in 10 ml Röhrchen) wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Tischzentifuge bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 100 µl einer 25%igen Saccharoselösung suspendiert, die mit 50 mM Tris pH 7,8 gepuffert war, und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die Bakterienzellwand aufzulockern wurden nacheinander 20 µl einer Lysozymlösung (10 mg/ml in 0,25 M Tris pH 8) und 20 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung zupipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis (0°C) wurden 150 µl Triton-Mix (50 mM Tris pH 8; 60 mM EDTA pH 8; 0,2 % Triton-X-100) hinzugefügt und unter wiederholten Drehbewegungen für weitere 5-15 Minuten bei 0°C inkubiert, bis die Probe leicht schleimig wurde. Um die niedermolekulare Plasmid-DNA vom Zellmaterial abzutrennen, wurde 15 Minuten lang in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C (Kaltraum) abzentrifugiert. Der mehr oder weniger kompakte Niederschlag wurde mit einer Eppendorfpipette angesaugt und vorsichtig herausgezogen. Der verbleibende Überstand konnte für eine erste Analyse direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden oder zur Abtrennung der RNA

mit RNAse behandelt und für Restriktionsverdauungen weiter gereinigt werden.

- Modifizierter Schnellaufschluß:
Die Zellen einer 5-ml-Übernachtkultur wurden abzentrifugiert, in einem Teil des Kulturmediums resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß übertragen und erneut 15 Sekunden lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Gemisch aus 20 µl Lysozym (10g/ml) und 10 µl 0,2 M EDTA aufgenommen und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Das Ausfließen der niedermolekularen DNA wurde durch einen osmotischen Schock erreicht. Dazu wurden dem Ansatz 200 µl bidestilliertes Wasser hinzugefügt, die Zellen kurz am Rüttler aufgewirbelt und nach 3-10 Minuten Inkubation auf Eis abzentrifugiert. Die Plasmidausbeuten nach diesem Verfahren waren besser, die Verunreinigungen mit zellularer DNA geringer als beim vorher beschriebenen.

- Schnellaufschluß durch Kochen nach Holmes (1981):
Die abzentrifugierten Bakterien einer 5-ml-Übernachtkultur wurden in 0,4 ml STET-Puffer aufgenommen, mit 30 µl Lysozym (10 mg/ml) ca. 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann 1 Minute lang bei 100°C im Wasserbad gekocht. Nach Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge (10-15 Minuten) wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und 30 Minuten lang bei -20°C gefällt. Die DNA wurde 10 Minuten lang im Kaltraum abzentrifugiert, einmal mit 70%igem eiskalten Äthanol gewaschen und im Lyophilisator getrocknet. Meist wurde die DNA ohne nachfolgende RNase-Behandlung ungeschnitten auf ein Gel aufgetragen oder mit geeigneten Restriktionsenzymen (5-10 Ansätze waren möglich) verdaut. Die Restriktionsverdauungen mußten relativ schnell abgeschlossen sein (30 Minuten, 1 Einheit Enzym), da die DNA-Präparationen nicht nukleasefrei waren.
STET-Puffer: 8 % Saccharose, 5 % Triton X 100, 50 mM EDTA und 50 mM Tris pH 8.

- RNase-Behandlung und Phenolisierung:
Wurden nach der Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA kleine Fragmente erwartet, so mußte die RNA, die im Agarosegel den Bereich ab etwa 800 bp bis zu den sehr kleinen Fragmenten überdeckte, durch RNase-Behandlung beseitigt werden. Dazu wurde entweder der Ansatz nach der Restriktionsverdauung mit 1 µl RNase-Lösung (1 mg/ml), oder der gesamte Schnellaufschluß mit 10 µl RNase versetzt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Unmittelbar zuvor wurde die RNase-Lösung (1 mg/ml in 50 mM Natriumacetat pH 5,0) zur Denaturierung von DNase-Verunreinigungen 10 Minuten lang gekocht. Nach der RNase-Behandlung wurde die Plasmid-DNA zweimal mit Phenol extrahiert, zweimal mit Äther ausgeschüttelt und mit Äthanol gefällt.

3.9.2 Reinigung von Plasmid-DNA durch Gradientenzentrifugation

Zur Plasmidreinigung im großen Maßstab wurden 100 bis maximal 250 ml einer Übernachtkultur in einer Sorvall Zentrifuge im GSA-Rotor abzentrifugiert (vgl.3.8.2). Das Zellsediment wurde zunächst mit einer Pipette in 1,5 ml 25%iger Rohrzuckerlösung (in 50 mM Tris pH 8) vollständig suspendiert und, gemischt mit 0,25 ml Lysozym (5 mg/ml in 0,25 M Tris-HCl pH 8) und 0,5 ml EDTA (0,2 M, pH 8), 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann wurden 2 ml Triton-Mix (50 mM Tris pH 8; 60 mM EDTA; 0,2 % Triton X 100) zugesetzt und so lange unter vorsichtigem Bewegen auf Eis weiterinkubiert, bis der Ansatz leicht schleimig war. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert. Für die Gradientenzentrifugation wurden 3,325 g CsCl in 3,5 ml des Zellüberstands gelöst und mit 175 µl Ethidiumbromid (20 mg/ml) gut gemischt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Sorvall OTD-65 B Ultrazentrifuge in einem TV-865 (Sorvall/DuPont) Vertikalrotor bei 18°C und 47000 rpm über Nacht. Nach der Zentrifugation wurden unter UV-Licht das Röhrchen mit einer Spritze seitlich angestochen und die Plasmidbande abgezogen. Das Ethidiumbromid wurde entfernt, indem dreimal mit CsCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt wurde. Anschließend wurde dialysiert, phenolisiert und erneut

dialysiert wie in 3.2.1 beschrieben.

3.9.3 Reinigung der Plasmid-DNA über Säulenchromatographie

Auch zweimal über CsCl-Gradienten gereinigte Plasmid-DNA enthielt noch so große Mengen an tRNA, daß z.B. die 5'-Markierung mit T4-Polynukleotidkinase empfindlich gestört wurde. Da die überwiegende Mehrzahl der freien 5'-Enden in einem Kinaseansatz mit Plasmid-DNA von der t-RNA angeboten wurde, wurde der Großteil des ^{32}P-Phosphats auch dort eingebaut. Deshalb erwies es sich in solchen Fällen als zweckmäßig, die über Gradienten gereinigte und dialysierte Plasmid-DNA über eine A4-Molekularsieb-Säule (Bettvolumen 10 ml) von der t-RNA zu trennen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 4-6 Tropfen gesammelt. Daraufhin wurden durch Gelelektrophorese eines Aliquots jeder Fraktion die DNA-haltigen Fraktionen ermittelt und vereinigt.

3.9.4 Kolonie-Hybridisierung

Um eine große Zahl von Klonen auf den Einbau viraler DNA überprüfen zu können, wurde die Technik der Kolonie-Hybridisierung gewählt (Grunstein und Hogness, 1975; Grunstein und Wallis, 1979). Dazu wurden die Bakterien nach einem Karomuster auf Agarplatten über Nacht angezogen. Zur Markierung der Petrischale und als Positivkontrolle wurde auf jeder Platte ein spezifisches Muster mit einem charakterisierten Klon angeimpft. In einem speziellen Fall war es Klon pGA613, der das AdFL-Pst-H-Fragment vom rechten Ende des AdFL-Genoms enthielt. Um die Bakterien auf Filter zu übertragen, wurde ein trockener, runder Nitrozellulose-Filter über die Kolonien gelegt. Nachdem er auf der ganzen Fläche benetzt war, wurde er wieder abgezogen. Die Bakterienkolonien klebten dann quantitativ am Filter. Zur Lyse der Bakterienkolonien wurde der Filter 3 Minuten lang auf ein mit 10 % SDS getränktes Whatman Filterpapier gelegt (Kolonien nach oben). Die Denaturierung in 0,5

M NaOH, 1,5 M NaCl und Renaturierung in 0,5 M Tris pH 8, 1,5 M NaCl erfolgte auf dieselbe Weise jeweils 5 Minuten lang. Nach fünfminütiger Behandlung mit 2xSSPE (siehe 3.6.7) wurden die Filter zunächst 60 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet und dann 2 Stunden lang bei 80°C gebacken. Nach diesem Schritt kann man sie aufbewahren. Der Hybridisierung muß ein Vorwaschen der Filter vorausgehen. Dazu wurden die Filter auf einer Wasseroberfläche kurz benetzt, in Plastiktüten eingeschweißt und 2 Stunden lang bei 42 °C in einem Vorwaschpuffer bie 42 °C im Wasserbad geschüttelt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte wie in 3.6.7 beschrieben.

Vorwaschpuffer: 50 mM Tris pH8; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS

4. ERGEBNISSE

4.1 Bildung infektiöser Viruspartikel in HeLa- und 3T3-Zellen

Um die Virusausbeuten in menschlichen Zellen und Mäusezellen miteinander zu vergleichen, wurden HeLa- und 3T3-Zellen mit Mausadenovirus (AdFL) bei einer Infektionsmultiplizität von 10 ffu pro Zelle infiziert. Die Zellen wurden 5 Stunden nach Infektion mit Trypsin von den Kulturflaschen gelöst und unverdünnt mit frischem Medium in eine neue Flasche übertragen. Das erschien deshalb sinnvoll, weil in früheren Experimenten mehrere Tage nach Infektion immer noch infektiöse Virus-Partikel, wenn auch im Laufe der Zeit mit abnehmenden Titern, in AdFL-infizierten HeLa-Zellen gefunden worden waren. Bei einem speziellen Versuch war festgestellt worden, daß ein Virusinoculum, das 3 Tage lang bei 37°C inkubiert worden war, noch immer infektiöse Partikel enthielt. Das mit der Infektion eingebrachte infektiöse Virusmaterial sollte daher nach einer genügend langen Adsorptionszeit durch Trypsinisierung zerstört werden.

Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden die Zellüberstände und die Zellen selbst auf infektiöse Partikel getestet. Dies geschah durch Infektion frischer 3T3-Zellen mit geeigneten Verdünnungen aus dem Überstand und aus durch Einfrieren/Auftauen aufgeschlossenen Zellen. Die Zahl infektiöser Partikel wurde dann durch Immunfluoreszenz ermittelt. Tabelle 4-1 zeigt das Ergebnis zweier Experimente, wobei im ersten die Zellen nach der Infektion noch nicht trypsinisiert wurden.

Vier Tage nach Infektion wurde in HeLa-Zellen mit $2{,}7 \times 10^4$ ffu pro Milliliter Zellextrakt der maximale Titer gefunden (das entspricht etwa 10^7 Zellen; je 400 Zellen bilden also ein infektiöses Viruspartikel). Im Überstand befinden sich zum gleichen Zeitpunkt $2{,}2 \times 10^3$ ffu, im Überstand einer nicht trypsinisierten Kontrollplatte dagegen 3×10^5, also um einen Faktor von etwa 100 mehr. Der maximale Virustiter im Maus-3T3-System wurde

ebenfalls 4 Tage nach Infektion erreicht. Er lag mit 1 x 10^7 ffu pro Milliliter Zellextrakt (5 x 10^6 Zellen) und 1,1 x 10^7 ffu pro 40 Milliliter Überstand um einen Faktor von 100 bis 1000 höher als im menschlichen System. Wenn auch nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen ist, daß in diesem Experiment noch Ausgangsvirus von der Infektion gezählt wurde, so muß man doch aus diesen Daten folgern, daß im HeLa-System Mausadenovirus produziert werden kann, allerdings um zwei bis drei Zehnerpotenzen weniger als im Maus-System. Im folgenden wird wegen der klaren quantitativen Unterschiede hinsichtlich der Virusproduktion in beiden Systemen vom permissiven AdFL-3T3- gegenüber dem nicht permissiven AdFL-HeLa-System die Rede sein.

Sehr deutliche Unterschiede ließen sich auch in der Zellmorphologie in beiden Systemen nach der Infektion mit AdFL-Virus feststellen. Besonders bei hohen Multiplizitäten der Infektion waren spätestens vier bis fünf Tage nach Infektion 3T3-Zellen restlos abgestorben und von der Kulturflasche abgelöst. Die HeLa-Zellen änderten zwar auch ihr Aussehen und nahmen eine etwas angeschwollene, abgerundete Form an, konnten aber bis zu drei Wochen nach der Infektion durch wiederholten Mediumwechsel am Leben erhalten werden (der Versuch wurde nach dieser Zeit abgebrochen). Infektiöses Virus war zu dieser späten Zeit nicht mehr zu finden.

Für die geringe Infektiosität der Extrakte AdFL-infizierter HeLa-Zellen sind drei Ursachen vorstellbar:

Möglicherweise werden zwar in großer Zahl Viruspartikel erzeugt, die jedoch für 3T3-Zellen nicht infektiös sind. Dies konnte man ausschließen, da es nie möglich war, AdFL-Viruspartikel aus HeLa-Zellen über CsCl-Gradienten zu reinigen, wie das routinemäßig aus 3T3-Zellen geschah. Denkbar wäre auch, daß das System Partikel produziert, die bei einer CsCl-Zentrifugation instabil sind, oder, als dritte Möglichkeit, daß wichtige Virusbausteine (DNA und Strukturproteine) fehlen und tatsächlich kein oder wenig Virus gebildet werden kann. Diesen und anderen Fragen wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen nachgegangen.

Zellen	Tage nach Infektion	Fluoreszierende Zellen pro Kulturflasche Experiment I	Experiment II
HeLa infiziert mit AdFL	4	$4,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
	5	nicht getestet	$9,6 \times 10^3$
	7	$4,9 \times 10^4$	nicht getestet
	10	$2,1 \times 10^4$	0
	14	0	nicht getestet
	21	0	nicht getestet
HeLa uninfiziert	4	0	0
	7	0	nicht getestet
3T3 infiziert mit AdFL	3	nicht getestet	6×10^6
	4	$7,4 \times 10^6$	1×10^7
Überstand aus infizierten HeLa passiert	4	nicht getestet	ca. 2000
	5	nicht getestet	ca. 7000
	7	nicht getestet	ca. 5000
	10	nicht getestet	ca. 2500
Überstand aus inf. HeLa nicht passiert	4	nicht getestet	4×10^5
Überstand aus inf. 3T3	4	nicht getestet	$1,7 \times 10^7$

Tab. 4-1: Permissivität von HeLa-u.3T3-Zellen gegenüber einer Infektion mit AdFL.
Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde der Virustiter aus Zellextrakten AdFL-infizierter HeLa- und 3T3-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion auf permissiven 3T3-Zellen bestimmt. Der Virustiter in HeLa-Zellen ist gegenüber den 3T3-Zellen um 2-3 Zehnerpotenzen reduziert. Die leuchtenden Zellen (Foci; 10^2 Zellen) wurden 3 Tage nach der Infektion ausgezählt.

4.2 Infektionsverlauf in AdFL-infizierten Zellen

Der Ablauf einer AdFL-Infektion in 3T3- und HeLa-Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz ähnlich wie bei Vogt (1969) beschrieben untersucht. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden die Zellen mit Äthanol fixiert und mit einem gegen AdFL-Viren gerichteten Antiserum aus Kaninchen inkubiert. In beiden Systemen wurden ab dem dritten Tag nach der Infektion fluoreszierende Zellen gefunden. Da mit hoher Multiplizität infiziert worden war (10 ffu/Zelle), leuchteten alle 3T3-Zellen bereits nach 3 Tagen auf - allerdings mit unterschiedlicher Intensität. Nach 4 Tagen leuchteten alle 3T3-Zellen gleich hell, waren aber bereits abgestorben und lösten sich von der Unterlage ab. Dagegen erschienen bei den HeLa-Zellen nach 3 Tagen nur einige wenige fluoreszierende Foci. Bis zum siebten Tag wurde eine Zunahme der Fluoreszenz auf bis zu 90 % der Zellen beobachtet. Abbildung 4-1 zeigt in Bild A die Immunfluoreszenz von 3T3-Zellen am dritten, in Bild B die von HeLa-Zellen am zehnten Tag nach der Infektion. Die beiden Fotografien stammen aus einem Experiment, das ähnlich wie das oben beschriebene durchgeführt wurde. Die Infektion erfolgte jedoch mit geringerer Multiplizität (1 ffu/Zelle).

4.3 DNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen

Das Auftreten einer positiven Immunfluoreszenz in beiden Systemen ist ein Hinweis auf die Synthese sogenannter "später" viraler Proteine, da das Antiserum gegen gereinigte Viruspartikel hergestellt worden war. Voraussetzung für die späte Transkription und damit für die späte Proteinsynthese im Infektionszyklus ist aber die Replikation der viralen DNA. Deshalb wurde in beiden Systemen die DNA-Synthese in Pulsexperimenten untersucht. Dazu wurden halbdichte HeLa- und 3T3-Zellen mit 5 ffu AdFL pro Zelle infiziert und 25, 31, 38, 49 und 73 Stunden nach Infektion 2 Stunden lang mit ^{3}H-Thymidin radioaktiv markiert. Die Zellen

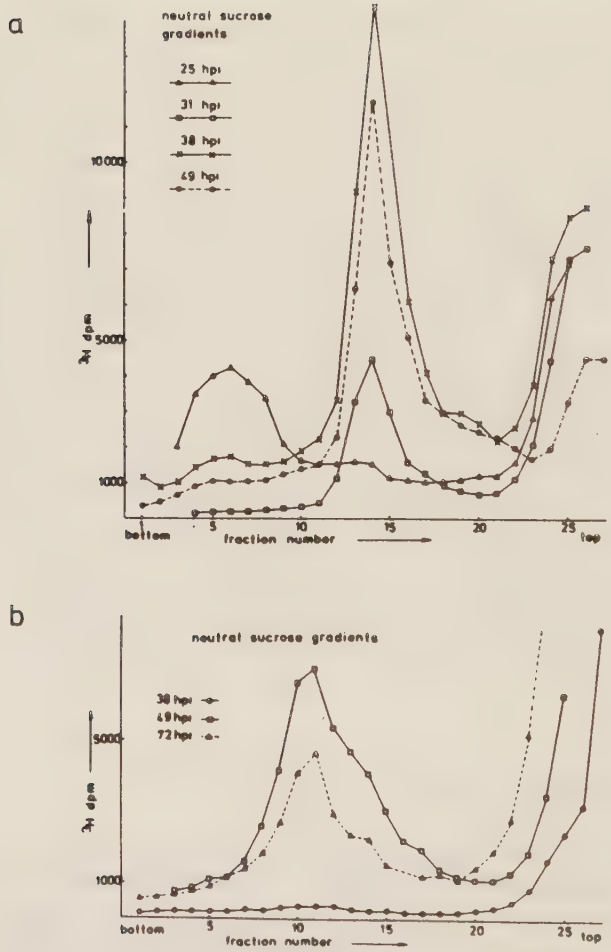


Abb. 4-2: Untersuchung der DNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen durch Pulsexperimente.
Die DNA-Syntheserate wurde 38, 49 und 72 Stunden nach Infektion mit AdFL bestimmt. Die Reinigung der DNA erfolgte über neutrale Rohrzuckergradienten (Sucrosegradienten). Die gemessene Radioaktivität (^{3}H-dpm/10^6 Zellen) wurde gegen die Fraktionsnummer der Gradienten aufgetragen. a DNA-Synthese in 3T3-Zellen; b DNA-Synthese in HeLa-Zellen.

wurden gründlich gewaschen, mit einem Gummiplättchen abgeschabt, auf einem 5-20%igen neutralen Rohrzuckergradienten (Kathmann, 1976) lysiert und zusammen mit einem ^{14}C-markierten Ad2-DNA-Marker zentrifugiert. Ein Aliquot jeder Fraktion der Gradienten wurde im Szintillationszähler gezählt. Abbildung 4-2 zeigt die Profile der 3T3- und der HeLa-Rohrzuckergradienten. Es wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin in Zerfälle pro Minute (dpm), bezogen auf 10^{6} Zellen, gegen die Fraktionsnummer der Gradienten aufgetragen. Im 3T3-System erscheint der höchste Gipfel 38 Stunden nach Infektion (hpi), im HeLa-System 49 hpi, also 11 Stunden später. Die breiteren und damit niedrigeren Gipfel bei den Experimenten mit HeLa-Zellen entstehen durch die methodisch bedingten Unterschiede, die beim Gießen der Rohrzuckergradienten oder bei der Zentrifugation auftreten können. Man konnte das an der Form der Gipfel der Marker-DNA erkennen, der in den HeLa-Gradienten ebenfalls sehr breit war. Der Marker ist in Abbildung 4-2 der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet. Um das Ergebnis des Versuchs noch klarer zu zeigen, wurde in Abbildung 4-3 eine andere Darstellungsweise gewählt: Die Radioaktivität unter den Gradientengipfeln (^{3}H dpm) wurde summiert und gegen die Zeit nach der Infektion (in Stunden) aufgetragen. Man erkennt deutlich den um 11 Stunden parallel verschobenen Anstieg der DNA-Synthese in den HeLa-Zellen. Die Replikationsrate, also die pro Zeiteinheit neu synthetisierte DNA, erreicht etwa das gleiche Niveau wie im permissiven System. Zwar wurde bei anderen Versuchen in HeLa-Zellen manchmal eine geringere DNA-Synthese gefunden, mindestens jedoch erreichte sie 30 %.

Ein berechtigter Einwand an dieser Stelle wäre, daß zunächst noch nicht bewiesen wurde, daß der DNA-Gipfel in den Rohrzuckergradienten auch wirklich AdFL-DNA-Synthese darstellt. Der Gipfel lag zwar auf gleicher Höhe wie der der Marker-DNA. Das bedeutet aber nur, daß DNA dieser Größe synthetisiert wurde, und sagt über deren Herkunft nichts aus. Deshalb sollte der Nachweis erbracht werden, daß es sich auch tatsächlich in beiden Zellinien um AdFL-DNA-Synthese handelte. Aus diesem Grund wurde aus den Gradienten mit höchster Replikationsrate die DNA der Gipfelfraktionen

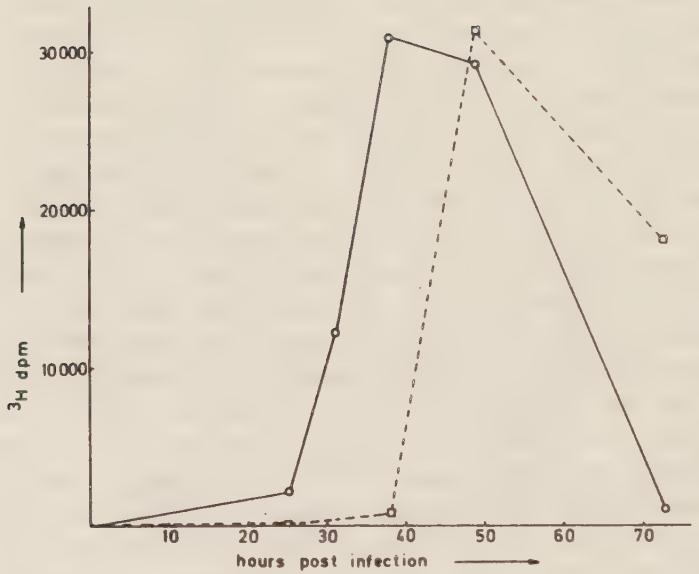


Abb. 4-3: Kinetik$_3$ der AdFL-DNA-Synthese.
Durch ^{3}H-Thymidin-Pulse wurde die AdFL-DNA-Synthese in 3T3- (——o——) und HeLa-Zellen$_3$ (- - -□- - -) untersucht. Gezeigt wird der Einbau von ^{3}H-Thymidin (dpm) pro 10^6 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion. Man erkennt deutlich den um etwa 12 Stunden späteren Beginn der DNA-Replikation in HeLa-Zellen. Weitere Erläuterungen im Text.

vereinigt, dialysiert und zusammen mit ^{14}C-markierter Ad2-Marker-DNA mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten. Die Proben wurden auf Agarose-Acrylamid-Mischgelen (Peacock, 1968) elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele in etwa 150 gleich große Scheibchen zerschnitten und eluiert. Anschließend wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. In Abbildung 4-4 ist die gemessene Radioaktivität (^{3}H und ^{14}C) gegen die Scheibchennummer aufgetragen. Beide Proben ergaben das selbe für AdFL spezifische HindIII-Muster. Es unterscheidet sich eindeutig vom HindIII-Muster der ebenfalls aufgetragenen ^{14}C-Ad2-DNA. Die

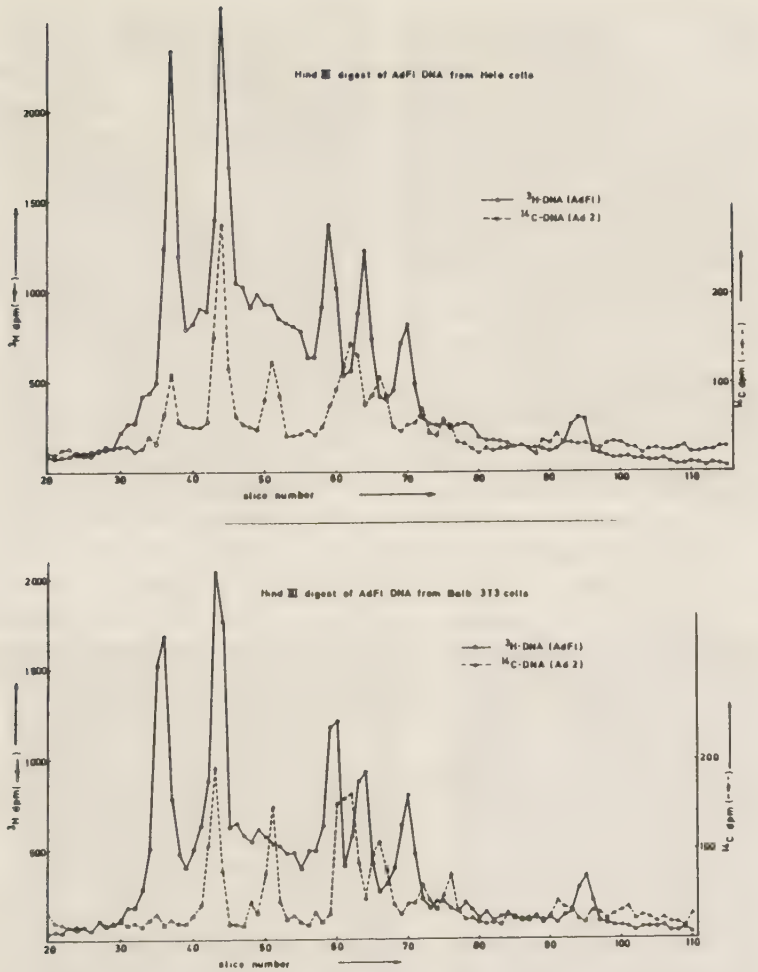


Abb. 4-4: Charakterisierung der DNA in AdFL-infizierten HeLa- und 3T3-Zellen.
Die radioaktiv markierte DNA aus dem vorher beschriebenen Experiment (Abb. 4-2; 4-3) und die ^{14}C-markierte Ad2-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten und auf einem Gel aufgetrennt. Nachdem das Gel in Scheibchen zerschnitten worden war, wurden die ^{3}H-dpm jedes Scheibchens bestimmt. Die DNAs aus beiden Zellsystemen zeigen das gleiche für AdFL-DNA typische Restriktionsmuster.

in HeLa gefundene virale DNA kann also nicht auf Verunreinigungen des AdFL-Virusstamms z.B. mit Ad2 zurückgeführt werden. Nochmals sei darauf hingewiesen, daß in den Pulsexperimenten ausschließlich neu synthetisierte DNA gemessen wurde, die DNA also nicht aus den zur Infektion verwendeten Viruspartikeln stammen kann.

Ein ähnlicher Versuch zeigt das gleiche Ergebnis noch anschaulicher. AdFL-infizierte HeLa- und 3T3-Zellen wurden zur Zeit der optimalen Virus-DNA-Replikation durch eine modifizierte Hirtextraktion (Schilling, 1975) aufgeschlossen. Die DNAs wurden wieder mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 4-5 zeigt ein solches mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit einer EcoRI- und einer HindIII-geschnittenen Serie. Mit den gleichen Enzymen geschnittene DNA aus gereinigten AdFL- und Ad2-Virionen wurden zur Kontrolle mit aufgetragen. Die DNAs aus beiden Zelltypen zeigen erwartungsgemäß wieder identische Restriktionsmuster, die mit demjenigen von isolierter DNA aus gereinigten AdFL- Partikeln übereinstimmen. Der Hintergrund in den aus Zellen isolierten Proben rührt von Verunreinigungen mit RNA und fragmentierter zellulärer DNA her.

Abb. 4-1: Immunfluoreszenz AdFL-infizierter 3T3- und HeLa-Zellen. A: 3T3-Zellen 3 Tage nach Infektion; B: HeLa-Zellen 10 Tage nach Infektion.

Abb. 4-5: Restriktionsmuster von AdFL-DNA.
Die virale DNA wurde aus AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen und als Kontrolle aus AdFL- und Ad2-Virionen isoliert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und auf Agarosegelen aufgetrennt. Die Fotografie zeigt das EtBr-gefärbte Gel. Die Reihen a-d zeigen eine EcoRI-, die Reihen e-h eine HindIII-Verdauung der DNAs. a und e: DNA aus Ad2-Virionen; b und f: DNA aus AdFL-Virionen; c und g: DNA aus AdFL-infizierten 3T3-Zellen; d und h: DNA aus AdFL-infizierten HeLa-Zellen.

Abb. 4-6: Virusspezifische DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion.
Virale DNA wurde aus 3T3- (a-e) und HeLa-Zellen (g-l) isoliert und mit HindIII geschnitten: a und g: uninfiziert; b und h: 25 Stunden nach Infektion (25 hpi); c und i: 45 hpi; d und j: 58 hpi; e und k: 71 hpi; l: 83 hpi; f: gereinigte DNA aus Viruspartikeln.

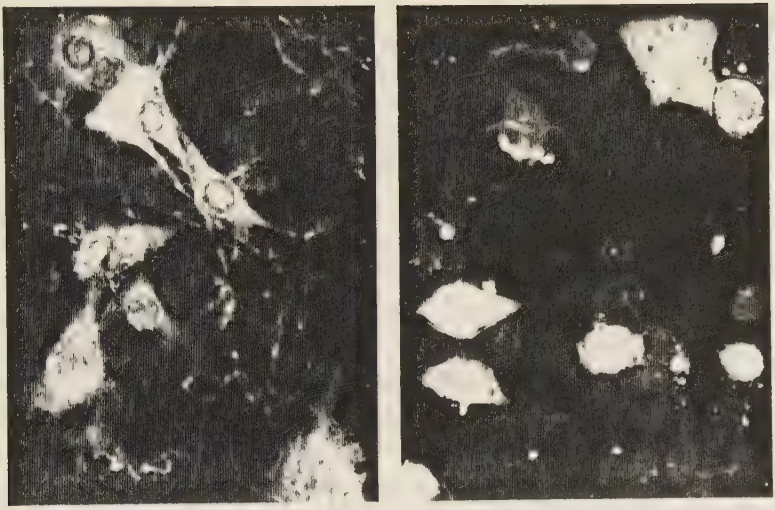


Abb. 4-1

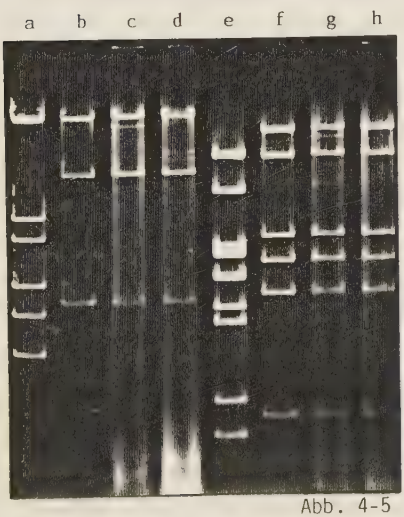


Abb. 4-5

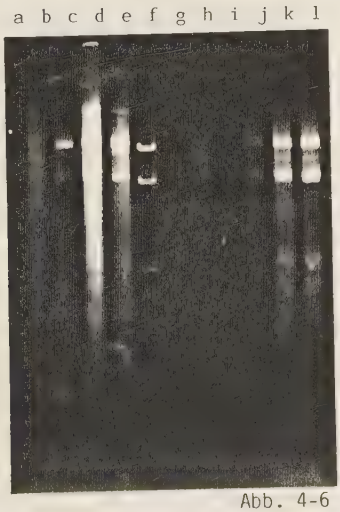


Abb. 4-6

Der gleiche Versuch kann auch in Form einer DNA-Replikationskinetik durchgeführt werden. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen zur Protein- und RNA-Synthese diente er immer als Kontrolle für eine einwandfrei gelungene Infektion. Früh nach Infektion ist auf dem Gel noch nicht das AdFL-spezifische Restriktionsmuster erkennbar; später tritt es deutlich hervor (siehe Abb. 4-6).

An dieser Stelle sollen die bisher beschriebenen Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt werden: Durch Pulsexperimente konnte der Beweis erbracht werden, daß in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen etwa gleich große Mengen viraler DNA synthetisiert werden. Die Immunfluoreszenz war in beiden Systemen positiv, allerdings mit deutlichen Unterschieden, was man als Hinweis auf die Produktion von Strukturproteinen werten kann. Trotzdem waren in HeLa-Zellen nur sehr wenig infektiöse Viruspartikel zu finden. Unser Augenmerk richtet sich im folgenden deshalb auf die Proteinsynthese in beiden Systemen.

4.4 Synthese später Proteine in HeLa- und 3T3-Zellen

4.4.1 Darstellung der Strukturproteine von AdFL im Vergleich zu Ad2

Um die Synthese von AdFL-Proteinen in HeLa-Zellen untersuchen zu können, war es zunächst nötig, das Muster der AdFL-Strukturproteine in denaturierenden Gelen darzustellen. Abbildung 4-7 zeigt das Proteinmuster von zweimal über Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigten AdFL-Viruspartikeln (b) und die Ad2-Strukturproteine (a). Die in den Reihen c und d dargestellten Proteinproben dienen der Ergänzung. Abbildung 4-7 c zeigt das Proteinmuster defekter Viruspartikel und stammt vom

selben Proteingel. In Reihe d sind noch einmal die Proteine intakter AdFL-Viruspartikel zu sehen, jedoch von einem anderen Gellauf, in dem die kleinen Strukturproteine besser aufgetrennt sind. Es handelt sich dabei um 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele, die mit Silbernitrat gefärbt wurden. Die mit römischen Ziffern bezeichneten Ad2-Proteine sind aus der Literatur bekannt (Maizel, 1968a; Anderson et al., 1973; Wadell, 1979; Persson, 1982). Die Proteinbanden von AdFL wurden mit den Buchstaben A bis J bezeichnet. Dabei trat das mit D bezeichnete Protein in verschiedenen Viruspräparationen unterschiedlich stark hervor, am deutlichsten in Partikeln geringerer Schwimmdichte, die weitgehend frei von Virus-DNA sind (sog. "defekte" oder "leere" Partikel). Das mit J bezeichnete AdFL-Protein ist in Reihe b nur sehr undeutlich zu sehen, da die kleinsten Proteine bei diesem Gel am Stützgel aufliefen. Gut erkennbar ist dagegen das Protein in Reihe d. Eine Lokalisierung der einzelnen Strukturproteine durch sukzessives Zerlegen der Viruspartikel, wie das für Ad2 beschrieben ist (Smith et al., 1965; Maizel et al., 1968b; Laver et al., 1969; Prage et al., 1970; Russell et al., 1971; Everitt et al., 1973), wurde nicht durchgeführt. Die Zuordnung einzelner Banden erfolgte deshalb durch den Vergleich mit Ad2 und ist somit spekulativ: Das mit dem Buchstaben A bezeichnete Protein, das die weitaus größte Menge und auch das größte Strukturprotein darstellt, wurde analog zu Ad2 als Hexon bezeichnet. Es ist mit einem Molekulargewicht von 90000 Dalton deutlich kleiner als das Ad2-Hexon mit 108000 Dalton (Jörnvall et al., 1981). Protein C könnte der Größe und Intensität nach dem Fiber- oder eventuell auch dem Core-Protein entsprechen. Ist auf diese Weise auch keine Beschreibung der Funktion der Proteine möglich, so sind sie zumindest durch ihre Lage im SDS-Polyacrylamid-Gel in Relation zu den Ad2-Proteinen definiert, so daß mit einem Vergleich des Proteinmusters in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen begonnen werden konnte.

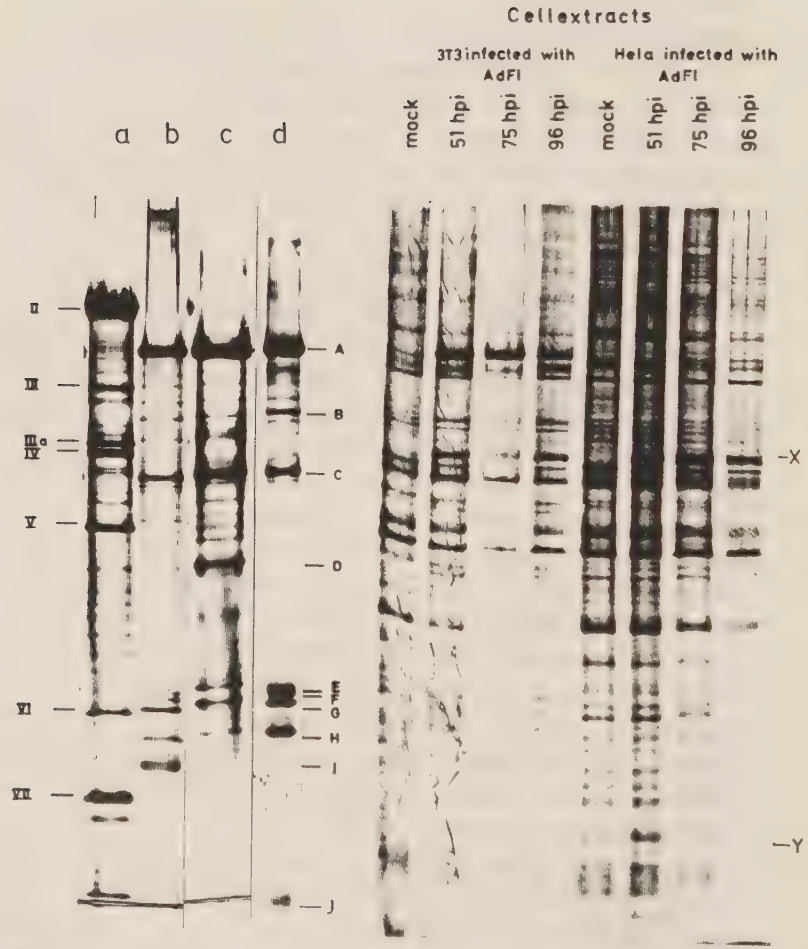


Abb. 4-7: Die Strukturproteine von AdFL (links). a zeigt das Proteinmuster von Ad2, b - d dasjenige verschiedener Präparationen von AdFL.

Abb. 4-8: Zeitlicher Ablauf der Proteinsynthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen spät nach Infektion (Autoradiographie; rechts).
Die Zellen wurden vor Infektion und 51, 75 und 96 Stunden nach Infektion (hpi) mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Pfeile markieren neu auftretende Proteinbanden.

4.4.2 Nachweis virusspezifischer Proteinsynthese durch Pulsexperimente mit ^{35}S-Methionin

3T3- und HeLa-Zellen wurden mit AdFL infiziert und 51, 75 sowie 96 Stunden nach Infektion jeweils 4 Stunden lang mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert. Nach diesem Puls wurden die Zellen eingefroren, abgekratzt, lysiert und auf ein denaturierendes Proteingel aufgetragen. Abbildung 4-8 zeigt die Autoradiographie des Gels. Links sind uninfizierte (mock) und infizierte 3T3-Zellen, rechts entsprechend die HeLa-Zellen dargestellt.
Die verwirrende Vielzahl ^{35}S-markierter Proteine macht eine Beschreibung schwierig. Trotzdem sind bei genauerem Betrachten spät nach der Infektion einige Proteinbanden deutlich zu sehen, die in uninfizierten Zellen fehlen. Sie wurden in der Fotografie mit Pfeilen markiert. Nur im Material aus 3T3-Zellen taucht eine sehr starke Bande in Höhe des A-Proteins auf, das wahrscheinlich das Hexon repräsentiert. In HeLa-Zellen findet man diese Bande nicht, oder zumindest tritt sie nicht so deutlich hervor wie in den 3T3-Zellen. Ein weiteres Protein, das, soweit erkennbar, nur in 3T3-Zellen auftritt, ist auf Höhe des Proteins B erkennbar. Eine Proteinbande, die in beiden Systemen gleich stark erscheint, liegt etwas oberhalb des Proteins C und wird in Abbildung 4.8 mit X bezeichnet. Es scheint sich dabei um ein für AdFL spezifisches Protein zu handeln, da es erst nach der Virusinfektion auftritt und unabhängig von der Wirtszelle das gleiche Molekulargewicht aufweist. Man findet es aber - zumindest mit dem gleichen Molekulargewicht - nicht in gereinigten Viruspartikeln. Es handelt sich also nicht um ein Strukturprotein, vielleicht aber um den Vorläufer eines solchen. Dagegen spricht jedoch, daß zu späterer Zeit kein kleineres Protein in entsprechender Menge auftaucht. Denkbar wäre, daß es sich um das DNA-bindende Protein von Mausadenovirus handelt. Ein solches für die Replikation der DNA essentielles Protein mit einem Molekulargewicht von 72000 ist für Ad2 beschrieben (Kruijer et al., 1983).
Die einsetzende Synthese des Proteins D ist im 3T3-System deutlich erkennbar. Im HeLa-System ist genau auf gleicher Höhe in uninfi-

zierten Zellen eine Bande zu sehen. Eine Entscheidung darüber, ob dieses Protein auch dort gemacht wird, ist deshalb nicht möglich. Das mit Y gekennzeichnete Protein erscheint in beiden Systemen 51 Stunden nach Infektion, wird aber 75 Stunden nach Infektion nicht mehr synthetisiert. Die Synthese weiterer Proteine ist auf diesem Gel nicht feststellbar. Die Ursache hierfür kann in der Wahl ungünstiger Pulszeiten liegen. Schwerwiegender sind wahrscheinlich andere Probleme, so z.B. zu geringe Syntheseraten, die bewirken, daß sich die viralen Proteine nicht so deutlich wie etwa das Hexon im 3T3-System hervorheben, oder die zahlreichen Banden zellulärer Proteine, die sicherlich zum Teil die gleichen Molekulargewichte aufweisen wie die viralen Proteine und diese deshalb überdecken. Letzteres Problem läßt sich am Beispiel des Proteins C im 3T3-System belegen. Exakt in gleicher Höhe läuft ein zelluläres Protein, das jedoch 51 Stunden nach Infektion deutlich stärker hervortritt bzw. vom viralen Protein überdeckt wird.

Betrachtet man das Gesamtbild, ohne sich mit einzelnen Proteinen zu befassen, so fällt ein deutlicher Unterschied beider Systeme auf: das Verhältnis virusspezifischer Proteine zur Gesamtproteinsynthese. Im 3T3-System wird zu den beiden späten Zeiten die Translation zellulärer Proteine zugunsten der viralen weitgehend unterdrückt, so daß diese deutlich stärker hervortreten. Dieser Effekt ist im HeLa-System nicht zu beobachten.

Abb. 4-9: Proteinsynthese in AdFL-infizierten 3T3-Zellen. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden die Zellen 2 Stunden lang mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Zellextrakte wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Neu auftretende Proteinbanden sind auf der Autoradiographie durch Pfeile markiert. a: uninfiziert; b: 3-5 hpi; c: 10-12 hpi; d: 25,5-27,5 hpi; e: 29,5-31,5 hpi; f: 36,5-38,5 hpi; g: 48-50 hpi; h: HeLa-Zellen, 56-58 hpi; i: 3T3-Zellen, 74-76 hpi.

Abb. 4-10: Proteinsynthese in AdFL-infizierten HeLa-Zellen. Der Versuch wurde ähnlich wie in 4-9 beschrieben durchgeführt. a: uninfiziert; b: 11-13 hpi; c: 20,5-22,5 hpi; d: 33,5-35,5 hpi; e: 40,5-42,5 hpi; f: 47,5-49,5 hpi; g: 58,5-60,5 hpi; h: 83,5-85,5 hpi; i: uninfiziert; j: 3T3-Zellen, 58,5-60,5 hpi.

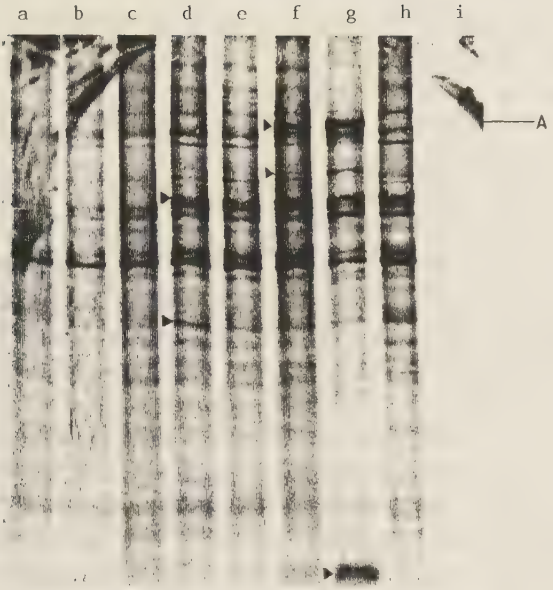


Abb. 4-9

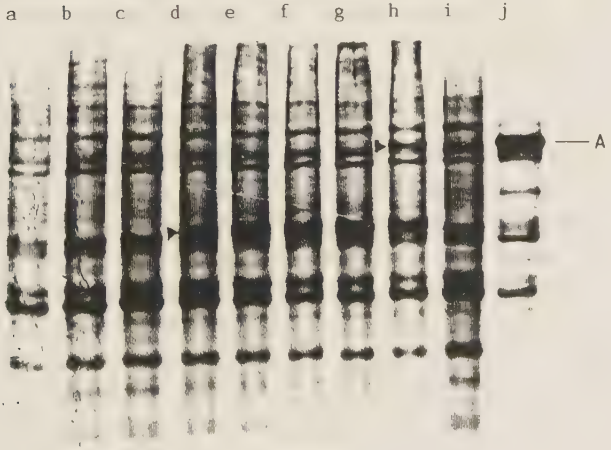


Abb. 4-10

Die in Abbildung 4-8 gewählten Pulszeiten sind das Ergebnis bereits früher durchgeführter Versuche, in denen das Erscheinen viraler Proteine nach der Infektion sehr viel detaillierter untersucht worden war. In diesem Gel sollten vor allem die drastischen Veränderungen spät und sehr spät nach Infektion im Vergleich zu uninfizierten Zellen herausgearbeitet werden. Die Abbildungen 4-9 und 4-10 zeigen die Autoradiographien zweier ausführlicher Testreihen, in denen der Zeitpunkt des Synthesebeginns der einzelnen Proteine möglichst genau bestimmt werden sollte. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier voneinander getrennt abgelaufener Versuche. Obwohl für den in Abbildung 4-9 dargestellten Zeitablauf eines Versuchs mit 3T3-Zellen das entsprechende HeLa-AdFL-Bild existiert, wurde Abbildung 10 einem anderen Experiment entnommen, das dem zeitlich verschobenen Ablauf der Virus-Synthese im HeLa-System besser Rechnung trägt. Die neu auftretenden Proteine sind wieder mit Pfeilen gekennzeichnet. Im 3T3-System tritt deutlich erkennbar das Hexon erstmals 36,5 bis 38,5 Stunden nach Infektion auf. Zum gleichen Zeitpunkt ist erstmals das Protein B erkennbar, das im Puls von 48 bis 50 hpi ebenso wie das Hexon sehr stark exprimiert wird. In diesem Zeitraum, wie auch im nächstspäteren Puls, ist ganz deutlich ein sehr kleines Protein zu erkennen. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um das Protein J. Dieses konnte im HeLa-System nie gefunden werden. Die D-Bande erscheint etwa 48 Stunden p.i.. Wegen der Unschärfe der Banden kleiner Proteine nicht mit Sicherheit festzustellen, aber doch sehr wahrscheinlich ist das Auftreten des Y-Proteins erstmals 25,5 Stunden nach Infektion. Eindeutig jedoch beginnt zum selben Zeitpunkt die Synthese des X-Proteins, die mit einer Verzögerung von ca. 10 Stunden auch im HeLa-System einsetzt und so mit dem Beginn der DNA-Replikation zusammenfällt. Wie bereits vorher angedeutet, könnte es sich dabei um das DNA-bindende Protein von AdFL handeln. Ein solches Protein (72 k DBP) ist im Ad2-System beschrieben. Es wird dort sowohl früh als auch spät nach Infektion produziert und ist unter anderem für die DNA-Replikation wichtig (Lenk, 1980). In dieser Versuchsreihe zeigte sich erstmals auch im HeLa-System eine schwache Bande auf

Höhe des A-Proteins. Sie trat jedoch erst spät (83.5 Stunden) nach Infektion auf.

4.4.3 Immunpräzipitation viraler Strukturproteine

Eine Möglichkeit, aus der Vielzahl der Proteine eines Zell-Rohextrakts die virusspezifischen Proteine genauer erkennen zu können, boten die verschiedenen Antiseren, die zur Verfügung standen. Das Anti-AdFL-Serum, das schon bei der Immunfluoreszenz (Abschnitt 4.2) zur Anwendung kam, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. R. Scheid am Max-von-Pettenkofer-Institut in München hergestellt. Es wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit SDS-denaturierten AdFL-Viruspartikeln gewonnen. Auf dieselbe Weise wurde das von Dr. Pünter von der Firma Hoechst zur Verfügung gestellte Anti-Ad2-Serum hergestellt. Außerdem hatten wir ein gegen das Ad2-Hexon gerichtetes Serum von Prof. L. Philipson, Uppsala, erhalten. Das hoch aktive, mit Adenovirus reagierende menschliche Serum wurde aus meinem eigenem Blut gewonnen. Mit Hilfe dieser Seren wurde versucht, aus Zellextrakten durch indirekte Immunpräzipitation nach Kessler (1975) mit Antiserum und Protein A (Pansorbin) virale Proteine anzureichern. Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, daß alle Antiseren fast ausschließlich nur ein Protein, nämlich das mit dem Buchstaben A bezeichnete, aus infizierten Zellextrakten ausfällten. Die Kreuzreaktion mit dem Anti-Ad2-Hexon-Serum wurde als weiterer Hinweis dafür gewertet, daß es sich bei diesem Protein tatsächlich um das AdFL-Hexon handelt. Es wird deshalb im folgenden als 'Hexon' bezeichnet. Abbildung 4-11 zeigt die Autoradiographie eines Proteingels. Neben dem Rohextrakt AdFL-infizierter 3T3-Zellen sind mit Anti-AdFL, Anti-Ad2, Anti-Ad2-Hexon und menschlichem Antiserum gefällte Proben desselben Extraktes aufgetragen. In allen 4 Fällen war ausschließlich das Hexon präzipitiert worden. Vor allem das menschliche Serum erwies sich als sehr hochtitrig. Der gleiche Versuch wurde mit dem selben

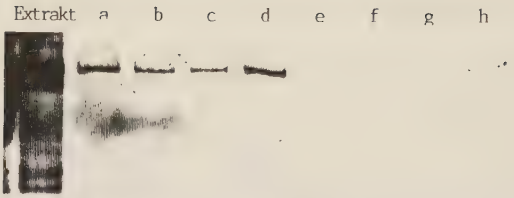


Abb. 4-11

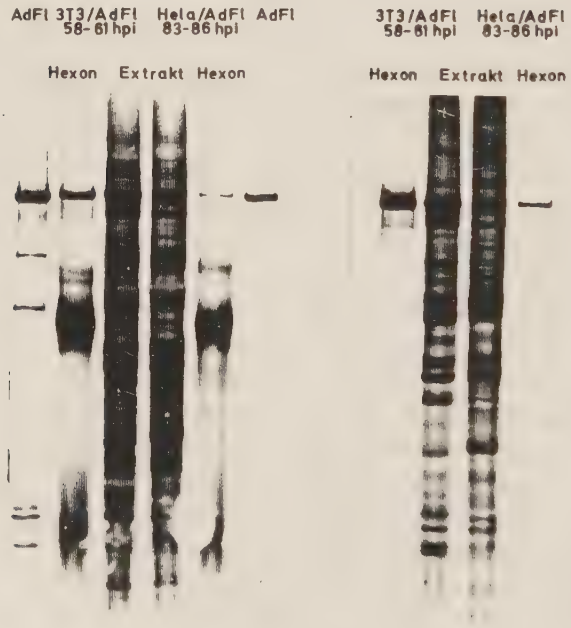


Abb. 4-12

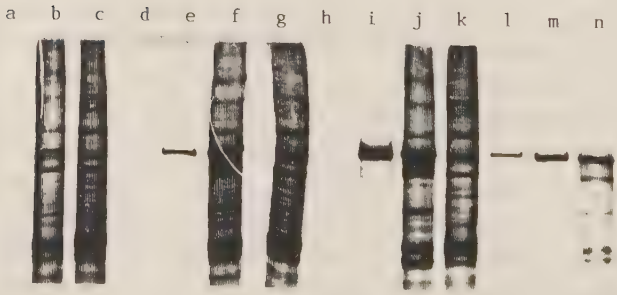


Abb. 4-13

Abb. 4-11: Spezifität verschiedener Antiseren.
Um die Wirkungsweise verschiedener Antiseren zu untersuchen, wurden Proteine aus AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen ausgefällt. Mit allen 4 Seren (3 aus Kaninchen, 1 menschliches) war es möglich, das AdFL-Hexon auszufällen. a-d zeigt Fällungen aus AdFL-infizierten 3T3-Zellen mit Anti-AdFL (a), Anti-Ad2 (b), Anti-Ad2-Hexon (c) und einem menschlichen Serum (d). e-h zeigt die gleiche Versuchsreihe mit der zehnfachen Menge eines HeLa-Zellextraktes.

Abb. 4-12: AdFL-Hexon-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen.
Infizierte Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Zellextrakte wurden mit Anti-Ad2-Hexon-Antiserum gefällt (seitliche Spuren "Hexon") ungefällt (mittlere Spuren "Extract") auf einem Proteingel aufgetrennt. Links ist das Gel nach Silberfärbung abgebildet, rechts die Autoradiographie desselben Gels. Der AdFL-Virus-Marker war nicht radioaktiv markiert und fehlt deshalb in der Autoradiographie. Für die radioaktive Markierung wurden die Zeiten gewählt, in denen maximale Hexonsynthese zu beobachten war.

Abb. 4-13: Synthese des AdFL-Hexon-Proteins in infizierten 3T3- und HeLa-Zellen.
AdFL-infizierte 3T3- und HeLa-Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert. Die Zellextrakte wurden entweder ungefällt (aus ca. 4 x 10^4 Zellen) oder nach Fällung mit Anti-Ad2-Hexon-Serum (ca. 1,5 x 10^5 Zellen) auf einem Proteingel aufgetrennt und durch Autoradiographie ausgewertet. In HeLa-Zellen kann mit Hilfe der Immunpräzipitation das Protein erstmals 58-61 hpi nachgewiesen werden, das in ungefällten Extrakten erst 83-86 hpi als schwache Bande erkennbar wird. a: 3T3, 40-43 hpi, gefällt; b: 3T3, 40-43 hpi, ungefällt; c: HeLa, 47-50 hpi, ungefällt; d: HeLa, 47-50 hpi, gefällt; e: 3T3, 47-50 hpi, gefällt; f: 3T3, 47-50 hpi, ungefällt; g: HeLa, 58-61 hpi, ungefällt; h: HeLa, 58-61 hpi, gefällt; i: 3T3, 58-61 hpi, gefällt, j: 3T3, 58-61 hpi, ungefällt; k: HeLa, 83-86 hpi, ungefällt; l: HeLa, 83-86 hpi, gefällt; m: 3T3, 83-86 hpi, gefällt; n: 3T3, 83-86 hpi, ungefällt.

Ergebnis mit AdFL-infizierten HeLa-Zellen durchgeführt, wobei für die Fällung die zehnfache Menge Rohextrakt eingesetzt wurde. Bei einer Immunpräzipitation Ad2-infizierter HeLa-Zellen wurde ebenfalls ausschließlich das Hexon ausgefällt. Das Anti-AdFL-Serum erwies sich dabei als inaktiv.

Mit dieser verfeinerten Untersuchungsmethode war die ursprüngliche Annahme, in AdFL-infizierten HeLa-Zellen entstehe überhaupt kein Hexon, eindeutig widerlegt. Zum genauen Nachweis dafür, wann in beiden Zellsystemen wieviel Hexon produziert wird, wurden Extrakte infizierter Zellen aus Pulsexperimenten mit dem Anti-Ad2-Hexon immunpräzipitiert. Die gefällten Proteine wurden wieder auf 15%ige Proteingele aufgetragen und durch Autoradiographie oder Silberfärbung nachgewiesen. Abbildung 4-12 zeigt ein solches Gel, links die Silberfärbung, rechts die Autoradiographie desselben Gels. Die gereinigten AdFL-Virusproben, die das gefärbte Gel flankieren, sind in der Autoradiographie nicht abgebildet. In beiden gefällten Proben erkennt man deutlich die Hexonbande. Es ist bis auf unbedeutende Verunreinigungen das einzige ausgefällte Protein. Während man im 3T3-System aber sehr große Mengen davon findet, ist die Spur im HeLa-System nur sehr schwach. In den ungefällten Extrakten in den beiden mittleren Reihen ist nur in der 3T3-Probe das Hexon eindeutig erkennbar. Für die Immunpräzipitation wurde das 3.3fache Volumen des in der Mitte aufgetragenen ungefällten Extraktes eingesetzt. Abbildung 4-12 stellt nur ein Teilresultat einer größeren Versuchsreihe dar, in der HeLa- und 3T3-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion 3 Stunden lang mit ^{35}S-Methionin markiert wurden. Die gezeigten Proben repräsentieren diejenigen Zeiten nach Infektion, in denen die größten Hexonmengen synthetisiert wurden, also 56 bis 61 Stunden nach Infektion in 3T3- und 83 bis 86 Stunden in HeLa-Zellen. Abbildung 4-13 zeigt die Autoradiographien der präzipitierten Proben zu allen untersuchten Zeiten, in denen Hexon fällbar war.

Die hochempfindliche Silberfärbung hat sich in diesen Experimenten zusammen mit der Immunpräzipitation als äußerst nützlich erwiesen,

so daß in weiteren Versuchen teilweise auf die radioaktive Markierung verzichtet werden konnte. Eine Verdünnungsreihe von hochgereinigtem Rinder-Serumalbumin in Zweierschritten, aufgetragen auf zwei Proteingele und angefärbt mit Coomassie-Blau einerseits und Silbernitrat andererseits ergab im Coomassie-blau gefärbten Gel eine unterste Nachweisgrenze zwischen 16 und 8 ng; bei der Silberfärbung waren 4 ng noch deutlich als Bande erkennbar; es zeigte sich aber auch noch bei der größten angesetzten Verdünnung von 0.5 ng ein Schatten auf der gleichen Höhe.

Die Daten über die Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion aus verschiedenen Experimenten sind in Abbildung 4-14 zusammengefaßt und graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, zu welchen Zeiten nach der Infektion ein Puls gesetzt wurde, wie lang dieser dauerte und ob kein (Strich), wenig (kleiner Balken) oder viel (großer Balken) Protein synthetisiert wurde. Die verschiedenen Versuche sind an der unterschiedlichen Schraffierung der Balken erkennbar. Die Beurteilung, ob viel oder wenig Proteinbiosynthese stattfindet, erfolgte subjektiv nach der Deutlichkeit der Proteinbanden im Gel. Eine quantitative Bestimmung wurde versucht, indem die Proteinbanden aus den Gelen ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt wurden. Die gemessenen Aktivitäten waren aber zu gering, um damit quantitative Vergleiche anstellen zu können. Eine vergleichende quantitative Messung wurde nur für die Hexonsynthese durchgeführt. Dazu wurde mit dem gegen Ad2-Hexon gerichteten Antiserum immunpräzipitiertes Hexon aus infizierten 3T3-Zellen aus dem schon vorher dargestellten Versuch (58-61 hpi) in verschiedenen Verdünnungen neben dem aus HeLa-Zellen gefällten AdFL-Hexon (83-86 hpi) aufgetragen. In der Autoradiographie wurde dann die Bande in der AdFL-Hexon-Verdünnungsreihe gesucht, die bezüglich ihrer Dichte der AdFL-Hexon-Bande aus HeLa-Zellen am nächsten kam. In unserem Versuch lag sie zwischen den im Verhältnis 1 : 81 und 1 : 243 verdünnten AdFL-Hexon-Proben aus 3T3-Zellen. Dies bedeutet, daß im HeLa-AdFL-System um einen Faktor von 100 bis 200 weniger Hexon synthetisiert wird als im permissiven 3T3-AdFL-System.

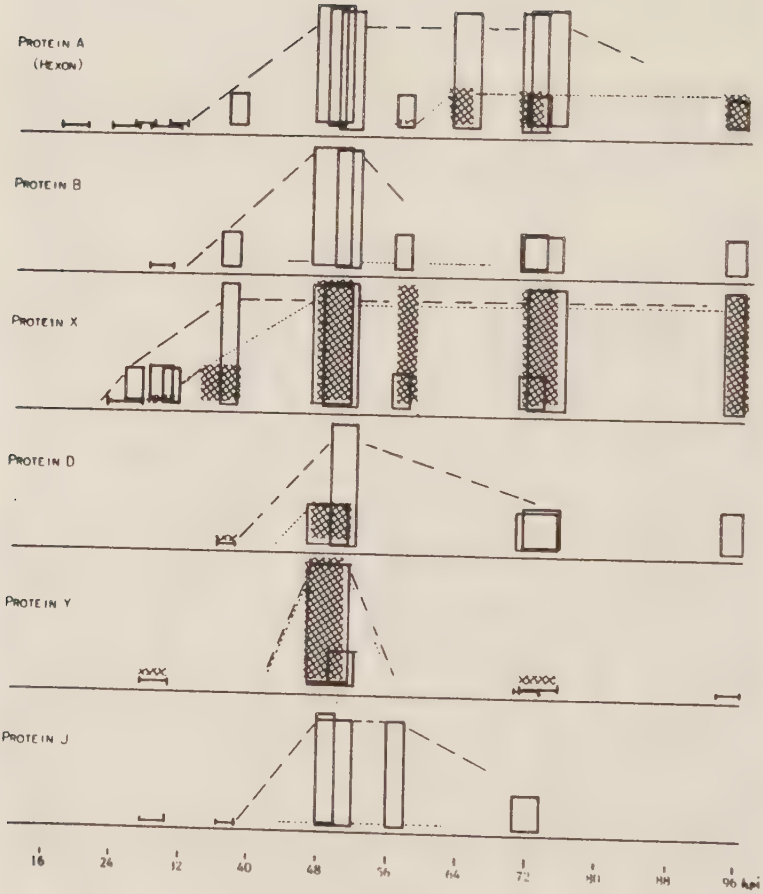


Abb. 4-14: Synthese verschiedener Proteine in 3T3- und HeLa-Zellen als Folge einer Infektion mit AdFL - Zusammenfassung der Daten aus verschiedenen Puls-Experimenten. Die Beurteilung, ob zu den angegebenen Pulszeiten kein (Strich), wenig (kurzer Balken) oder viel (langer Balken) Protein synthetisiert wurde, erfolgte subjektiv nach der Stärke der Banden auf den Autoradiographien oder Silberfärbungen der Gele. Die Bezeichnung der Proteine bezieht sich auf Abbildung 4-7. ▭ : Proteine aus 3T3-Zellen; ⊠ : Proteine aus HeLa

4.4.4 Identifizierung viraler Strukturproteine durch "Blotting"

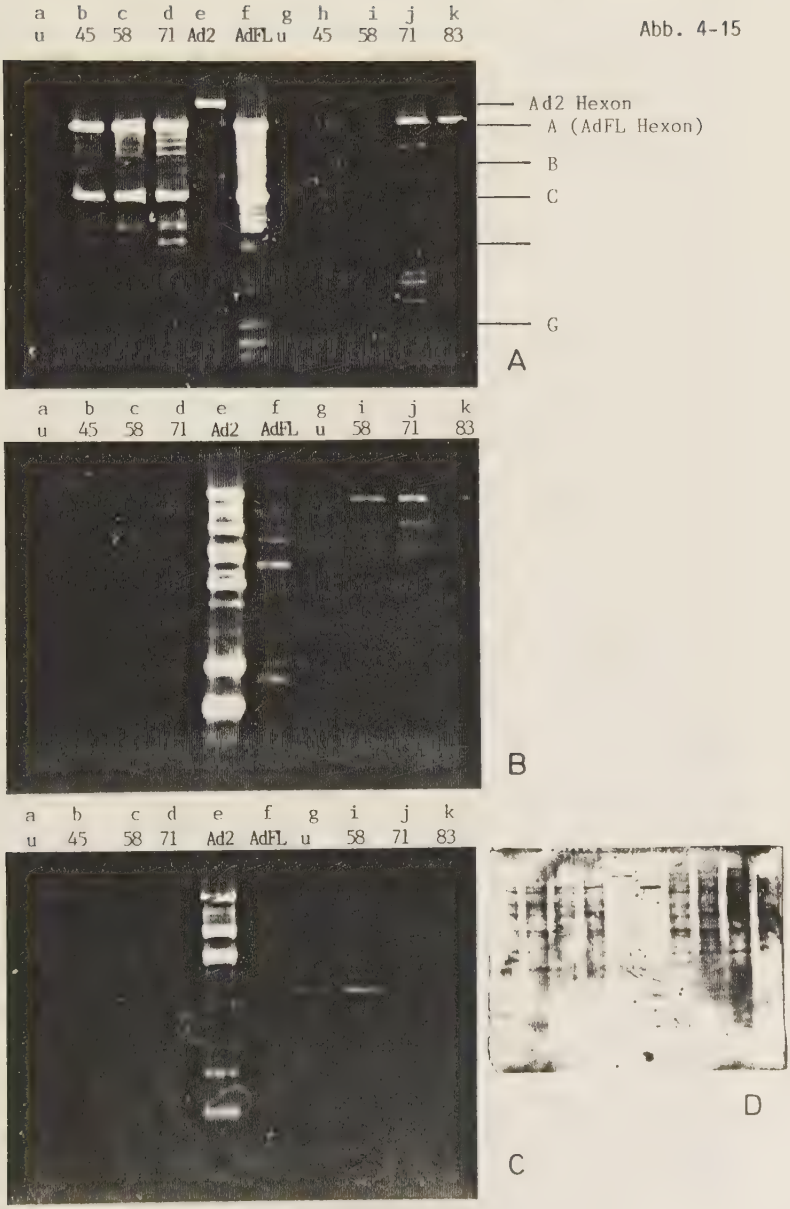
Zum selektiven Erkennen viraler Strukturproteine aus infizierten Zell-Rohextrakten bot sich noch eine andere, der Immunpräzipitation ähnliche Methode an: der sogenannte Immunoblot (Towbin, 1979; Bittner, 1980; Symington, 1981). Dazu wurden wieder 3T3- und HeLa-Extrakte zu verschiedenen Zeiten nach Infektion hergestellt. Eine radioaktive Markierung war dabei nicht erforderlich. Ein Erfolg der Infektion in beiden Systemen war bereits vorher aufgrund der Überprüfung der DNA-Synthese gewährleistet. Das Bild aus diesem Versuch ist in Kapitel 4.2 über DNA-Synthese abgebildet und erläutert. Es zeigt in beiden Systemen etwa gleichgroße Mengen an Virus-DNA. Die selben Extrakte wurden auf Proteingelen aufgetrennt. Von dort wurden die Proteine elektrophoretisch auf einen Nitrozellulose-Filter transferiert und ähnlich, wie schon bei der Immunfluoreszenz beschrieben, mit Antiserum und FITC-markiertem Antiserum angefärbt. Die Fluoreszenz ist unter UV-Licht bei 254 nm erkennbar. Abbildung 4-15 zeigt drei Immunblots von nahezu identischen Proteingelen mit 3T3- und HeLa-Zellextrakten (in den beiden letzten Blots wurden die Proben früh nach Infektion weggelassen). Jeder Proteinblot wurde mit einem anderen Antiserum angefärbt und zwar mit Anti-AdFL in Figur A, Anti-Ad2 in Figur B und Anti-Ad2-Hexon in Figur C. Daneben ist der nach der Fluoreszenzmarkierung mit Amido-Schwarz angefärbte Blot aus Figur C abgebildet. Mit dieser Färbemethode werden alle Proteine sichtbar gemacht. Das Ergebnis war überraschend, da es mit den Resultaten aus der Immunpräzipitation nicht übereinstimmt. Das Anti-AdFL-Serum färbt in der Probe mit gereinigtem Virus sehr viele Proteine an. Gut erkennbar sind Protein A, C, D, G, H, I. Besonders aufgefallen ist die sehr intensive Anfärbung von Protein C sowohl in gereinigtem Virus als auch in den 3T3-AdFL-Extrakten. Im Gegensatz dazu war in den Immunpräzipitationen praktisch ausschließlich Hexon zu finden. Interessant ist hier der Vergleich von HeLa- und 3T3-Extrakten. Wie bereits aus Immunpräzipitation bekannt war, wird in HeLa-Zellen Hexon synthetisiert, wenn auch deutlich weniger als in 3T3-Zellen. Dies läßt sich auch in diesem

Immunblot beobachten. Neu dagegen ist die Protein-C-Bande, die in den 3T3-Extrakten die Intensität der Hexonbande erreicht, jedoch in den infizierten HeLa-Zellen völlig fehlt. Hier dürfte ein Punkt getroffen sein, der für das Fehlen infektiöser Partikel im nicht permissiven HeLa-System wohl noch entscheidender ist als die reduzierte Hexonsynthese. Über die kleineren Strukturproteine ist auch hier wenig zu sagen, da sie schon in den 3T3-Extrakten nur sehr schwach angefärbt sind.

Eine weitere Überraschung bieten die Kreuzreaktionen. Bleiben wir zunächst noch beim ersten Blot: Das einzige eindeutig und auch sehr stark markierte Ad2-Strukturprotein ist das Hexon. Das AdFL-Antiserum zeigt also Kreuzreaktion mit dem Ad2-Hexon, was in der Immunpräzipitation nicht der Fall war. In Blot B erkennt man gut die Anfärbung vieler Ad2-Strukturproteine durch das Ad2-Antiserum. Nur sehr schwach dagegen und damit im Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunpräzipitation ist die Reaktion mit dem AdFL-Hexon. Merkwürdig ist die schwache Kreuzreaktion mit den meisten AdFL-Strukturproteinen (B, C und wahrscheinlich G und H). Eine weitere Proteinbande wird in den infizierten HeLa-Extrakten angefärbt. Sie liegt zwischen dem AdFL- und dem Ad2-Hexon und ist nur in den Zeiten zu finden, in denen die AdFL-Hexonsynthese auf höchsten Touren läuft. Es muß sich demnach um ein Protein handeln, das nur während einer Virusinfektion hergestellt wird. Im 3T3-System erscheint ein solches zu keiner Zeit an dieser Position.

Abb. 4-15: Nachweis virusspezifischer Proteine in Extrakten AdFL-infizierter 3T3- und HeLa-Zellen durch Immunoblots.
Die Zellextrakte wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion gewonnen, auf 3 Proteingelen in gleichen Mengen aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Filter A wurde mit Anti-AdFL-Serum, B mit Anti-Ad2 und C mit Anti-Ad2-Hexon behandelt. D zeigt den Filter aus C nach Anfärbung aller Proteine mit Amido-Schwarz. a : 3T3, uninfiziert; b : 3T3, 45 hpi; c : 3T3, 58 hpi; d : 3T3, 71 hpi; e : gereinigtes Ad2; f : gereinigtes AdFL; g : HeLa, uninfiziert; h : HeLa, 45 hpi; i : HeLa, 58 hpi; j: HeLa, 71 hpi; k: HeLa, 83 hpi.

Abb. 4-15


a b c d e f g h i j k
u 45 58 71 Ad2 AdFL u 45 58 71 83
Ad2 Hexon
A (AdFL Hexon)
B
C
G
A
a b c d e f g i j k
u 45 58 71 Ad2 AdFL u 58 71 83
B
a b c d e f g i j k
u 45 58 71 Ad2 AdFL u 58 71 83
C
D

Etwas enttäuschend sind die Resultate mit dem Anti-Ad2-Hexon-Serum, die in Blot C dargestellt sind. Es markiert zwar auch das Ad2-Hexon, aber nicht, wie man erwarten sollte, ausschließlich. Beim Vergleich der beiden Ad2-Proben in diesem und dem vorherigen Blot sieht man nur einen deutlichen Unterschied zwischen dem Anti-Ad2 und dem Anti-Hexon, nämlich das Fehlen der Proteinbande V, also dem Coreprotein von Ad2. Die Bezeichnung "Anti-Hexon" erscheint unter diesem Aspekt unkorrekt. Wieder im Gegensatz zu den Daten aus der Immunpräzipitation gibt es keine Kreuzreaktion mit dem AdFL-Hexon. Auch hier ist wieder im HeLa-System eine schwache Kreuzreaktion mit einem Protein zu beobachten, das zwischen den beiden Hexonsliegt, und zusätzlich, jedoch infektionsunabhängig, eine solche mit einem Protein etwa auf Höhe des Ad2-Core-Proteins.

Wie die Ergebnisse zeigen, konnten durch den Immunoblot zusätzliche wertvolle Informationen über die Synthese viraler Strukturproteine gewonnen werden. Die unterschiedlichen Resultate in der Immunpräzipitation und dem Immunoblot waren zunächst überraschend, aber doch erklärbar. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Proteine am Nitozellulosefilter in einem teilweise denaturierten Zustand gebunden sind. Die Proteine wurden zuerst auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Transfer erfolgt zwar unter nativen Bedingungen; das garantiert aber kein Zurückfalten in die natürliche Form (Bowen, 1979). Damit liegen im renaturierten Protein möglicherweise andere antigene Determinanten frei als in den nativen Proteinen, die bei der Immunpräzipitation untersucht wurden. Sie sind bei der "blotting"-Technik übrigens auch in dem Zustand, der den Bedingungen bei der Herstellung der Antiseren am ehesten entspricht. Denn vor der Immunisierung waren die Proteine in SDS denaturiert und durch Dialyse in TS renaturiert worden. Entscheidend für das unterschiedliche Verhalten der Antiseren ist wahrscheinlich die höhere Empfindlichkeit des Immunoblots. In der Immunpräzipitation müssen die Antigene in sehr hoher Verdünnung ausgefällt werden; im Blot ist das Antigen bereits auf kleinstem Raum konzentriert. Ähnliche Erfahrungen haben wir mit monoklonalen Antikörpern gemacht, die gegen

verschiedene Ad2-Strukturproteine gerichtet waren. Es war nicht möglich, durch Immunpräzipitation mit den Überständen virale Proteine aus Zellextrakten auszufällen. Dagegen konnte die Spezifität der Antikörper aus denselben Überständen im Immunoblot eindeutig bestimmt werden.

4.4.5 Einfluß der Infektionsmultiplizität auf die Proteinsynthese

Um den Einfluß der Viruspartikel, die bei der Virusinfektion pro Zelle eingesetzt wurden, auf die Proteinsynthese zu untersuchen, wurden in einem Parallelansatz HeLa- und 3T3-Zellen mit unverdünntem Virus (entspricht 6 ffu/Zelle), 1:4 verdünntem Virus (entspricht 1,5 ffu/Zelle) und 1:16 verdünntem Virusstamm (entspricht 0,4 ffu/Zelle) infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden wieder ^{35}S-Methioninpulse gesetzt. Die drei zu einer Pulszeit gehörenden Virus-Verdünnungen wurden nebeneinander auf Proteingele aufgetragen. Wie Abbbildung 4-16 zeigt, ist weder im 3T3- noch im HeLa-System zwischen der unverdünnt und der 1:4 verdünnt infizierten Probe ein Unterschied in der Intensität der Hexonbande zu sehen. Deutlich blasser wird aber die Bande in der 1:16-Verdünnung, was nicht überrascht, da unter diesen Bedingungen nicht mehr jede Zelle infiziert wird. Dagegen scheint es nicht möglich zu sein, durch eine höhere Multiplizität der Infektion die Hexonsynthese zu steigern. Allerdings scheint dadurch der Beginn der Hexonproduktion vorverlegt und der gesamte Infektionszyklus verkürzt zu werden. Das wurde in diesem Versuch nicht näher untersucht. Es gibt jedoch folgende Hinweise dafür:

1. In dem Puls 48-51 Stunden nach Infektion, der verhältnismäßig nah am Beginn der Hexonsynthese liegt, scheint in der unverdünnt infizierten 3T3-Probe die Hexonbande stärker zu sein (nicht gezeigt).
2. In den unverdünnt infizierten 3T3-Proben ist der Hintergrund an zellulären Proteinbanden geringer, was bereits bei früheren Experimenten in einer späten Phase des Infektionszyklus beobachtet wurde. Für das HeLa-System trifft jedoch beides nicht zu.

4.5 Synthese viraler RNA in HeLa- und 3T3-Zellen

Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, daß verschiedene Proteine in AdFL-infizierten HeLa-Zellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden. Am auffallendsten waren das Fehlen des C-Proteins (Immunoblot) und die reduzierte Hexonsynthese, die um einen Faktor von etwa 100 niedriger liegt als im permissiven System (Immunpräzipitation). Der Mangel an diesen Strukturproteinen erklärt das Fehlen intakter Viruspartikel.
Die Ursachen können auf drei Ebenen liegen:

- Auf der Transkriptionsebene, d.h. einer der Schritte, die von der DNA zur reifen mRNA führen, ist gestört.
- Auf der Translationsebene, d.h. die Information der mRNA kann nicht in ein reifes Protein übersetzt werden.
- Die Proteine werden zwar hergestellt, werden aber sofort proteolytisch gespalten.

Zunächst sollte untersucht werden, ob ein reifes Transkript für das Hexon hergestellt wird. Gedacht war vor allem an das in der Literatur beschriebene Beispiel des inkompletten Spleißens der mRNA des Fiberproteins im Ad2-Affenzell-System, das möglicherweise für die stark reduzierte Fibersynthese verantwortlich ist (Klessig und Chow, 1980; Anderson und Klessig, 1983). Vielleicht verursacht ein ähnlicher Defekt den Hexonmangel im AdFL-HeLa-System. Der Schwerpunkt der Nachforschungen wurde auf die Hexonsynthese gelegt, da sie am besten greifbar war:

- Die Region, die wahrscheinlich für das Hexon kodiert, ist durch Hybridisierungsversuche auf dem AdFL-Genom identifiziert worden (Larsen et al., 1979; Antoine et al., 1982 - siehe auch Diskussion). Mit Hilfe der klonierten DNA-Fragmente, die diesen Bereich abdecken, konnte man deshalb gut nach der entsprechenden mRNA suchen.
- Das Produkt (Hexon) war durch die Immunpräzipitation mit den Antiseren gut greifbar, was beispielsweise bei einer in-vitro-Translation wichtig ist.

Die RNA wurde durch Hybridisierungen charakterisiert. Dazu wurde

die RNA aus AdFL-infizierten 3T3-Zellen 25, 58 und 71 hpi und AdFL-infizierten HeLa-Zellen 58, 71 und 83 hpi nach Jones und Shenk (1979) isoliert. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen mit aufgearbeitet. Die RNA-Proben wurden auf Formaldehyd- oder Glyoxalgelen aufgetrennt. Als Orientierungsmarker wurde DNA (AdFL-Restriktionsfragmente oder pBR322-Fragmente) auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Proben können allerdings nicht als Größenmarker verwendet werden, da doppelsträngige DNA in Gelen völlig anders als die einzelsträngige RNA läuft. Die Gele wurden auf Nitrozellulosefilter geblottet, die dann mit geeigneten ^{32}P-markierten, klonierten AdFL-DNA-Fragmenten hybridisiert wurden. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie. Abbildung 4-17 zeigt ein Beispiel. Als DNA-Marker wurden AdFL-HindIII-Fragmente aufgetragen. In Figur A ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel gezeigt, in Figur B die Autoradiographie des Blots nach Hybridisierung mit Klon 1450, der das BamHI-B-Fragment von Position 64,2 bis 94,3 des AdFL-Genoms enthält und damit auch einen Teil des AdFL-Hexongens.

Im Ethidiumbromid-gefärbten Gel treten in allen Proben die Banden der ribosomalen RNAs sehr stark hervor (Pfeile). Die 18S-ribosomale RNA ist etwa 2100, die 21S-rRNA 5000 Basen lang. Nimmt man für das AdFL-Hexon ein Molekulargewicht von 90000 Dalton an, dann muß die dafür kodierende mRNA mindestens 2200 Basen lang sein und deshalb zwischen den beiden ribosomalen RNAs liegen. Auf der Autoradiographie des Nitrozellulosefilters ist in diesem Größenbereich eine Bande erkennbar (Pfeil). Man findet sie nur in infizierten Zellen und nur in dem Zeitraum, in dem in 3T3- und HeLa-Zellen die maximale Synthese des Hexons und anderer Strukturproteine beobachtet wurden (vgl. Abb. 4-14 - 3T3: 48-72 hpi; HeLa: 64-96 hpi). Diese RNA-Bande tritt in beiden Zellsystemen etwa gleich stark hervor. Die stark reduzierte Hexonsynthese in HeLa-Zellen kann man deshalb nicht auf das Fehlen der nötigen mRNA zurückführen.

Dabei müssen jedoch einige Einschränkungen gemacht werden: Das Auflösungsvermögen eines Agarosegels, wie es in diesem Versuch verwendet wurde, reicht nicht aus, um geringe Größenunterschiede der RNA-Moleküle in beiden Systemen nachzuweisen. Außerdem müßte

gezeigt werden, daß bei diesen RNA-Molekülen capping und Polyadenylierung normal verlaufen sind. Schließlich müßte man durch in-vitro -Translationsexperimente herausfinden, welche RNA für das AdFL-Hexon kodiert bzw. ob diese RNA überhaupt translatiert werden kann. Ist dies der Fall, so beweist das aber immer noch nicht, daß diese RNA auch im HeLa-System eine reife Vorlage für die Proteinsynthese darstellt.

Abb. 4-16: Abhängigkeit der AdFL-Hexon-Synthese in infizierten HeLa- und 3T3-Zellen von der Multiplizität der Infektion.
HeLa- (a-c) und 3T3-Zellen (d-f) wurden mit 6 ffu/Zelle (1), 1,5 ffu/Zelle (2) oder 0,4 ffu/Zelle (3) infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert. a: HeLa, 62 hpi; b: HeLa, 71 hpi; c: HeLa, 89 hpi; d: 3T3, 48 hpi; e: 3T3, 62 hpi; f: 3T3, 71 hpi.

Abb. 4-17: RNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (Näheres im Text).
A: EtBr-gefärbtes RNA-Formaldehydgel; B: RNA-Blot hybridisiert mit Klon 1450, der teilweise hexonkodierende Sequenzen enthält; - a: linearisierte AdFL-Klone; b: AdFL-HindIII-DNA-Fragmente; c: 3T3-Zellen, uninfiziert; d: 3T3, 25 hpi; e: 3T3, 58 hpi; f: 3T3, 71 hpi; g: HeLa-Zellen, uninfiziert; h: HeLa, 58 hpi; i: HeLa, 71 hpi; j: HeLa, 83 hpi.

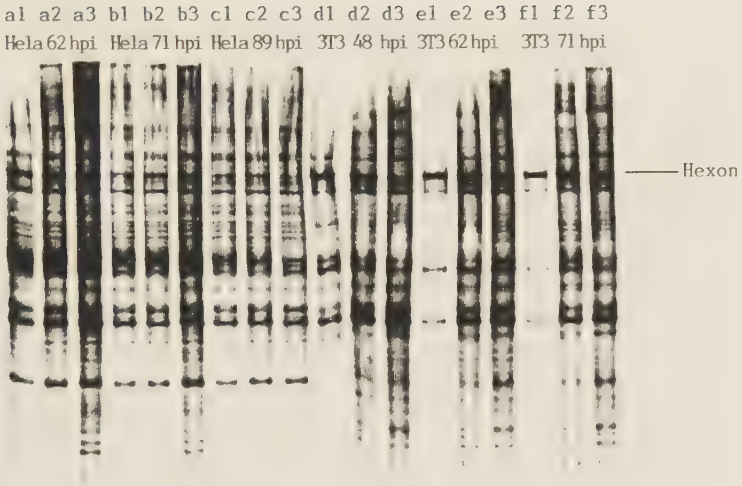


Abb. 4-16

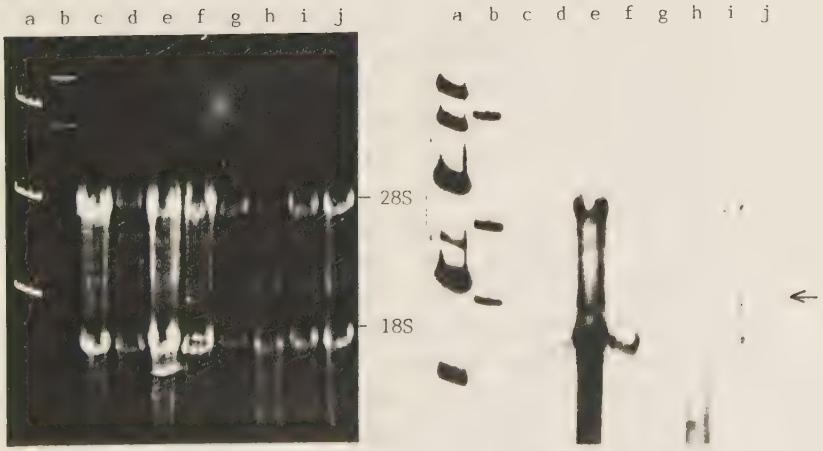


Abb. 4-17

4.6 Klonierung von Mausadenovirus-DNA-Fragmenten

Mit der Klonierung von AdFL-DNA-Fragmenten wurden verschiedene Ziele verfolgt:

- Zunächst war geplant, durch Hybridisierungsexperimente vergleichende Untersuchungen zur mRNA-Synthese, insbesondere zur Hexon-mRNA-Synthese in AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen, anzustellen. Außerdem sollte möglicherweise eine Transkriptionskarte von AdFL erstellt werden. Dazu wurden in größeren Mengen DNA-Hybridisierungsproben benötigt, die die einzelnen Abschnitte des Virusgenoms repräsentieren. Zwar wäre es möglich, die nötigen DNA-Fragmente aus Gelen zu isolieren - allerdings mit der Einschränkung, daß die Reinigung zeitraubend und nie vollkommen ist; denn aus Gelen isolierte Fragmente sind immer mit anderen verunreinigt. Durch eine Klonierung kann man (wenn notig, im Milligramm-Maßstab) schnell und einfach absolut reine Fragment-DNA gewinnen - eine auch in Anbetracht der mühsamen Isolierung kleiner DNA-Mengen aus Viruspartikeln verheißungsvolle Aussicht (in Zellkultur erhielt man ca. 300 µg AdFL-DNA aus ca. 10^9 Zellen = 1 m^2 Einschicht-Zellrasen).
- Darüber hinaus war mit der Klonierung der Endfragmente, die die Startpunkte der Replikation enthalten, beabsichtigt, Untersuchungen zur in-vitro -Replikation von AdFL-DNA anzustellen. Die Versuche hierzu wurden von Frau C. Lally in unserem Labor durchgeführt.

Für die Klonierung am besten geeignet erschienen uns die AdFL-PstI-Fragmente, da die Schnittstellen für dieses Enzym relativ gleichmäßig über das Genom verteilt liegen. Außerdem haben viele Klonierungsvektoren wie z.B. pBR 322 eine PstI-Schnittstelle in einer günstigen Position. Andere Restriktionsenzyme kamen nicht in Betracht, da sie entweder extrem große AdFL-Fragmente erzeugen (z.B. EcoRI, BamHI und SalI) oder in den gängigen Vektoren keine Schnittstellen haben (z.B. XhoI).

4.6.1 Klonierung eines Fragmentgemisches

Mausadenovirus-FL-DNA wurde vollständig mit der Restriktionsendonuklease PstI verdaut und das Gemisch der Fragmente mit dem PstI-linearisierten E.coli-Vektor pBR322 (Bolivar et al.,1977) ligiert. In rekombinanten Plasmiden sollte die Ampicillinresistenz, in deren Bereich auf dem pBR322-Plasmid die einzige PstI-Schnittstelle lokalisiert ist, zerstört sein. Es wurden also nur solche Bakterienkolonien durch sog. Schnellaufschlüsse charakterisiert, die auf Tetracyclinmedium wachsen, aber ampicillinsensitiv sind. Insgesamt wurden 48 Klone untersucht. Dazu wurden sie in einer 5-ml-Übernachtkultur angezogen, mit Lysozym und Triton X 100 aufgeschlossen und unverdaut auf einem Agarosegel zusammen mit ungeschnittener pBR322-DNA als Marker aufgetrennt. Die untersuchten Klone erhielten die Nummern 127 bis 174. Plasmide, die wegen des Einbaus fremder DNA im Gel langsamer liefen als reines pBR322, wurden durch Restriktionsverdauungen weiter charakterisiert. Da die damals angewandte Methode des Schnellaufschlusses häufig DNA-Moleküle ergab, die mit Restriktionsenzymen nicht verdaubar waren, erfolgte eine nähere Charakterisierung häufig erst nach der Reinigung der Plasmid-DNA über CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten.
Abbildung 4-19 zeigt eine Reihe von Plasmiden, die nach Schnellaufschluß und PstI-Verdauung zusammen mit PstI-verdauter AdFL-DNA aufgetragen wurden. Tabelle 4-2 gibt eine Übersicht über alle untersuchten Plasmide.
Bei der Klonierung der Fragment-Gemische ergaben sich eine Reihe von Problemen:

- Neben Fragmentgrößen, die AdFL-PstI-Fragmenten entsprachen, tauchten häufig Bruchstücke auf, für die sich kein Partner im AdFL-Restriktionsmuster fand (vgl. Tab. 4-2 Klon 148, 149, 151 usw.). Sie werden im folgenden als "ni-Plasmide" (ni = nicht identifizierbar durch PstI-Verdauung) bezeichnet.
- Dabei muß besonders betont werden, daß sich diese ni-Fragmente mit PstI problemlos aus dem pBR-Anteil ausschneiden lassen, also von PstI-Schnittstellen flankiert sein müssen. Fraglich ist die

Klon	Fragmentgröße % AdFL	AdFL-Fragment	Gesamtzahl der untersuchten Klone
167	10,8 (C)	C? (Kart.)	1
129	10,2 (D)	B, J (Hybr.)	2
135	10,2 (E)	E (Kart.)	2
154	10,2 (E)	E (Kart.)	
130	5,5 (I)		
172			
148	ca.5,0 (<I)	DE,G (Hybr.)	10
149			
161			
164	4,1 (J)	G? (Kart.)	
169	3,9 (<J)	F (Hybr.)	6
162	3,3 (<J)	DE,L (Hybr.)	
145	2,6 (K)	K (Kart.)	3
174		K (Kart.)	
143	2,1 (<L)	B (Hybr.)	7
150	0,9 (M)	M? (Kart.)	12
168	0,9 (M)	M? (Kart.)	

Tab. 4-2: Ergebnis der Klonierung eines AdFL-PstI-Fragmentgemisches in pBR322.
Spalte 1 gibt die Nummern der Klone an, die genauer untersucht wurden. Spalte 2 gibt die Größe des Fragments an, das nach PstI-Verdauung erhalten wurde. Spalte 3 ist zu entnehmen, welchem AdFL-PstI-Fragment der entsprechende Klon durch Kartierung oder Southernblot-Hybridisierungen zugeordnet werden konnte. Spalte 4 gibt die Gesamtzahl der Klone an, die Fragmente des Größenbereichs eingebaut haben.

Herkunft dieser ni-Plasmide: Bruchstücke, die durch Nukleaseaktivität entstanden sind, könnten zwar unter Umständen in den mit PstI linearisierten Vektor eingebaut werden, wobei aber in der Mehrzahl der Fälle die PstI-Schnittstelle zerstört würde. Wahrscheinlicher ist folgende Erklärung: In der AdFL-DNA-Präparation, die bei der Klonierung verwendet wurde, müssen PstI-Schnittstellen an Positionen auftreten, die im Wildtyp nicht zu finden sind. Bei einer PstI-Verdauung entstehen dann Fragmente, die keinem aus der Restriktionskarte bekannten Fragment entsprechen. Möglicherweise stammt diese DNA aus sogenannten inkompletten Viruspartikeln, deren Entstehen innerhalb von Wildtyppopulationen verschiedener Adenoviren beobachtet wurde (Mak, 1971; Igarashi et al., 1975; Daniell, 1976; Tibbetts, 1977; Deuring et al., 1981). Larsen (1982) machte diese Beobachtung auch bei Mausadenovirus FL: Durch Infektion von 3T3-Zellen mit AdFL in hoher Multiplizität konnten nach mehreren Viruspassagen defekte Partikel in großer Zahl angereichert werden. Die DNA aus diesen Partikeln zeigte Deletionen großer Bereiche des AdFL-Genoms (jedoch nie der Molekülenden) oder Insertionen von Wirtszell-DNA.
Damit ließe sich das Auftreten unserer ni-Fragmente erklären. Es wurde bei der Virusvermehrung zwar nie bewußt mit sehr hoher Multiplizität infiziert; unser Virusinokulum wurde aber in den letzten Jahren nicht mehr durch erneute Plaqueisolierung gereinigt und ist deshalb schon über sehr viele Passagen in Gebrauch. Zwei weitere Beobachtungen unterstützen die Annahme, daß unsere AdFL-Präparationen möglicherweise inkomplette Partikel enthalten. Manchmal zeigte die AdFL-DNA nach einer Restriktionsverdauung auf den Agarosegelen einen deutlichen Hintergrund, der das bekannte Hauptmuster überlagerte. Da eine Verunreinigung mit Nukleasen auszuschließen war, konnten Fragmente aus inkompletten Partikeln dafür verantwortlich sein. Außerdem traten bei der Reinigung von AdFL-Viruspartikeln in CsCl-Gradienten meistens mehrere Virusbanden auf, die manchmal sehr schlecht voneinander zu trennen waren.

- Eine weitere Erklärung für das Auftreten von ni-Fragmenten wären Rekombinationsereignisse während der Klonierung, bei der

Teile der PstI-Fragmente verlorengingen. Ein solcher Mechanismus ist jedoch unwahrscheinlich, da bei der Klonierung von gereinigten Fragmenten keine oder sehr wenig ni-Fragmente zu finden waren.

- Aus dem Auftreten der ni-Plasmide ergab sich eine weitere Schwierigkeit: Ein kloniertes PstI-Fragment, das seiner Größe auf dem Agarosegel nach einem Fragment im AdFL-PstI-Muster entspricht, muß nicht zwangsläufig dieses repräsentieren. Es kann zufällig wie ein AdFL-PstI-Fragment laufen, in Wahrheit aber ein ni-Fragment sein, wie sich das beispielsweise erst sehr spät bei Klon 164 herausstellte. Aus diesem Klon konnte mit PstI ein Fragment herausgeschnitten werden, das exakt die Länge des AdFL-Pst-J-Fragmentes hatte.
- Unregelmäßigkeiten im Lauf von Restriktionsfragmenten im Agarosegel können aber auch durch Verunreinigungen zustande kommen. So läuft eine Probe, die sehr viel RNA enthält, was in Schnellaufschlüssen durchaus der Fall ist, meist etwas langsamer als die entsprechende DNA-Probe ohne RNA.
- Ein weiteres Problem war die Unzulänglichkeit der publizierten AdFL-Restriktionskarten. Vor allem die PstI-Restriktionskarte war unvollständig, die Karten für andere Restriktionsenzyme waren nicht auf die PstI-Karte abgestimmt. Die Charakterisierung von klonierten Fragmenten durch Restriktionsenzyme konnte deshalb oft keine eindeutige Zuordnung erlauben. Zum Beispiel konnte erst mit Hilfe der neu konstruierten Restriktionskarte von AdFL (vgl.4.8) bewiesen werden, daß der bereits oben erwähnte Klon 164 nicht das Pst-J-Fragment, sondern andere Genombereiche enthielt, wahrscheinlich einen Teil des Pst-G-Fragmentes.
- Kleine Fragmente lassen sich im allgemeinen leichter klonieren als große und sind deshalb bei der Klonierung eines Fragmentgemisches überrepräsentiert. Die Suche nach den größten Pst-Fragmenten ließ deshalb einen unverhältnismäßig hohen Arbeitsaufwand erwarten.

Um die fehlenden, vor allem die großen AdFL-PstI-Fragmente zu erhalten, wurden im folgenden gereinigte AdFL-Fragmente kloniert. Außerdem wurde mit einer genauen Kartierung des AdFL-Genoms mit

Hilfe der gereinigten klonierten Fragmente begonnen, und Fragmente unklarer Herkunft wurden durch Southernblothybridisierungen charakterisiert.

4.6.2 Klonieren gereinigter Mausadenovirus-PstI-Fragmente

Die Reinigung der PstI-Fragmente von AdFL erfolgte aus Agarosegelen wie in 3.6.4 beschrieben. Dabei wurden meistens die Fragmente AB, CDE und HI zusammen isoliert, weil sie sich auf den Gelen wegen ihrer geringen Größenunterschiede nur sehr schlecht voneinander trennen ließen. Die Klonierung erfolgte in den E.coli-Vektoren pUC7 und pUC8 (Viera und Messing, 1982). Der Aufbau der pUC-Vektoren ist in Abbildung 4-18 dargestellt. Die pUC-Vektoren bestehen aus der 2297 Basenpaare langen "linken Hälfte" des pBR322-Vektors von der PvuII-Schnittstelle an Position 2065 bis zur EcoRI-Schnittstelle an der Position 4360 mit einigen Mutationen zur Eliminierung von Restriktionsschnittstellen für die Enzyme PstI und HincII. Die ß-Lactamaseaktivität (Ampicillinresistenz) bleibt erhalten. In Position 2351 (bezogen auf pBR322) ist ein 433 Basenpaare langes Fragment des E.coli-lac-Z-Gens mit einer Polylinkerregion insertiert. Im Falle von pUC8 enthält diese der Reihe nach eine EcoRI-, XmaI-, SmaI-, BamHI-, SalI-, AccI-, HincII-, PstI- und eine HindIII-Schnittstelle. pUC9 enthält die gleichen Erkennungsstellen in umgekehrter Reihenfolge. pUC7 enthält eine symmetrische Polylinkerregion mit einer EcoRI-, BamHI-, SalI-, AccI-, HincII-, PstI-, HincII-, AccI-, SalI-, BamHI-, EcoRI-Schnittstelle. Wird der E.coli-Stamm JM83, der einen Defekt im chromosomalen lac-Z-Gen enthält, mit diesen Plasmiden transformiert, so wird die lac-Z-Aktivität komplementiert. Als Nachweis dieser Aktivität und damit der Aufnahme des Plasmides dient der hydrolytische Abbau von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indigo, einem Farbstoff, der die Bakterienkolonien blau färbt. Wird dagegen fremde DNA in die Polylinkerregion eingebaut, wird die lac-Z-Funktion zerstört, die

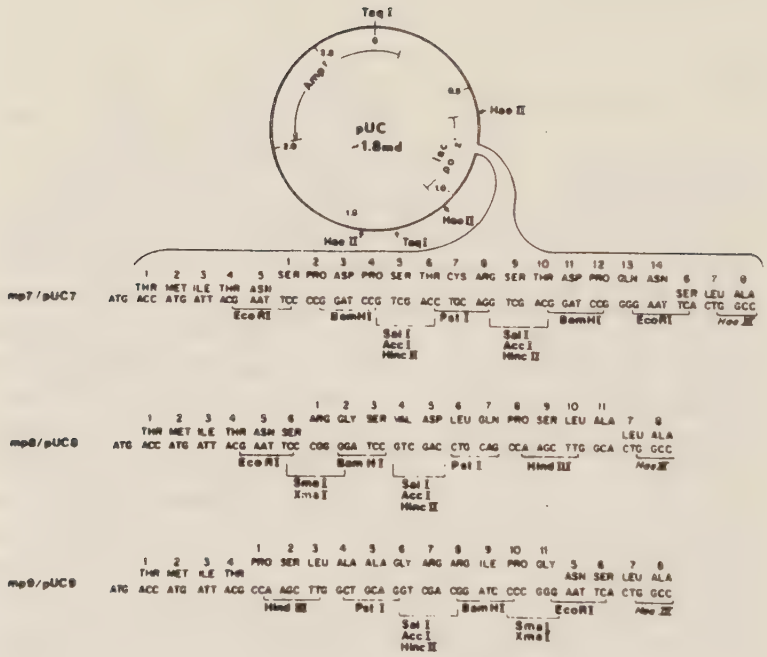


Abb. 4-18: Genetische Karte von pUC-Plasmiden (übernommen von Vieira, J. und Messing,J., 1982) - (Erklärung im Text)

Bakterien können keinen Farbstoff abspalten und sind auf der Agarplatte als weiße Kolonien erkennbar (siehe Abb. 4-20). Dies gilt jedoch nicht für Fragmentlängen bis zu 400 bp, solange der Leserahmen erhalten bleibt.

Tabelle 4-3 zeigt eine Aufstellung aller charakterisierten Klone. Stämme mit 200er-Nummern sind Klonierungen in pUC8, mit 500er-Nummern in pUC7. Da nur 2 AdFL-PstI-Fragmente interne EcoRI-Schnittstellen enthalten, lassen sich fast alle in pUC7 klonierten Fragmente mit EcoRI vollständig ausschneiden. Abbildung 4-21 zeigt ein Agarosegel mit einigen dieser Plasmide nach einer

Angebotene AdFL-Fragm.	Klonierte AdFL-Fragm.	Charakterisierte Klone in pBR322	pUC7	pUC8	Gesamtzahl gefunden/getestet
PstI A,B	PstI A	-	-	-	0/48
	PstI B	-	-	216, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 260,	16/18
PstI A	PstI B	-	-	1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906,	26/30
PstI CDE	PstI C	167?	-	224, 2201, 227, 228, 272, 273,(271)	7/23
	PstI D	-	-	223, 2261, 276, 280, 286, (271)	6/23
	PstI E	135, 154	561	274, 275, 277, 278, 279, 281, 282, 283, 285	9/23
PstI F (Endfragm.)	PstI F	-	-	1126,1127,1128	3/500
	PstI H			1113, 1116, 1130, 1131, 1135	5/500
PstI G	PstI G	-	553	231, 233, 239	3/4
PstI H (Endfragm.)	PstI H	- -	- -	613, 831	
PstI I	PstI I	-	543	-	
PstI J	-	-	-	-	
PstI K	PstI K	145, 174	523	-	
PstI L	PstI L	-	511, 513	246, 248, 249	3/4
PstI M	PstI M	150	501	-	
BamHI ABC	BamHI A	-	-	-	
	BamHI B	-	-	1449, 1450	2/26
	BamHI C	-	-	1433, 1435, 1436, 1437, 1439, 1441, 1442, 1444, 1445, 1451, 1452, 1454	13/26
PstI A/BamHI	PB 1	-	-	1701	

Tab. 4-3: Aufstellung der klonierten AdFL-Restriktionsfragmente. Spalte 1 gibt die Fragmentgemische an, von denen bei der Klonierung ausgegangen wurde, Spalte 2 die in den rekombinanten Plasmiden tatsächlich gefundenen Fragmente. Spalte 3 enthält eine Aufstellung der charakterisierten Klone, wobei der Vollständigkeit halber die eindeutig charakterisierten pBR322-Klone aus Tabelle 4-2 noch einmal aufgeführt wurden. Spalte 4 gibt die Zahl der Klone an, die das betreffende AdFL-Restriktionsfragment aufgenommen haben (links) im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Klone (rechts). Die Pfeile oberhalb der Plasmidnummern geben an, in welcher Orientierung das AdFL-Fragment eingebaut ist. Ein Pfeil nach rechts bedeutet, daß das Fragment in der links/rechts Orientierung, die durch die AdFL-Restriktionskarte definiert ist, in der Transkriptionsrichtung der β-Galactosidase eingebaut ist. Ein Pfeil nach links zeigt die Gegenorientierung.

PstI-Verdauung. Wie zu erwarten war, fehlen die beiden Endfragmente PstI F und PstI H (die Gründe dafür werden im folgenden Kapitel dargelegt). Aber auch zwei weitere Fragmente - PstI J und PstI A - konnten nicht gefunden werden. Die Hauptsuche galt dem PstI-A-Fragment, da dieses wahrscheinlich auch einen Teil der Hexon kodierenden Region repräsentiert. Es wurden insgesamt 18 Klone untersucht, die mit dem PstI-A/PstI-B-Fragmentgemisch (in pUC8) transformiert worden waren. Zwei Klone enthielten keinen Einbau, alle anderen hatten das PstI-B-Fragment aufgenommen. Da beide Fragmente annähernd gleich groß sind (PstI A = 5150 bp; PstI B = 4710 bp), würde man beide in einem Verhältnis von etwa 1 : 1 erwarten. Die Annahme, das PstI-A-Fragment könnte zu groß für eine Klonierung in pUC-Vektoren sein, wurde durch die selbe Versuchsserie widerlegt. Klon 271 enthielt Fragment PstI C und D, deren Summe mit 20,9 % des Gesamtgenoms noch deutlich über der Größe des A-Fragmentes mit 16,7 % liegt. Wie erst später gezeigt wurde, lassen sich noch sehr viel größere Fragmente in pUC8 klonieren. So konnten das BamHI-B-Fragment mit 30,1 % (9270 bp) und das BamHI-C-Fragment mit 25,6 % (7890 bp) des AdFL-Genoms in pUC8 vermehrt werden. In einem weiteren Versuch wurde das

Abb. 4-19: Klonierung eines AdFL-PstI-Fragmentgemischs in pBR322. Die Fragmente wurden nach einem Schnellaufschluß mit PstI aus dem Vektor ausgeschnitten. a,d,g,j,m,q: AdFL-PstI-Marker; b: Klon 167 (PstI-C-Fragment); c: Klon 154 (PstI-E-Fragment); e: Klon 129; f: Klon 130; h: Klon 148; i: Klon 164; k: Klon 169; l: Klon 162; n: Klon 145 (PstI-K-Fragment); o: Klon 143; p: Klon 150 (PstI-M-Fragment; Fragment bereits aus dem Gel herausgelaufen); u: Klon 169. Die Klone 129m 130, 148, 164, 169, 162 und 143 sind sog. ni-Plasmide.

Abb. 4-20: pUC8-transformierte Bakterienkolonien.
Die blauen Kolonien haben ein intaktes Plasmid aufgenommen, die weißen rekombinante Plasmide.

Abb. 4.21: Klonierte DNA-Fragmente von AdFL.
Aus rekombinanter Plasmid-DNA, die über CsCl-EtBr-Gradienten gereinigt worden war, wurde mit PstI oder EcoRI (bei pUC7-Plasmiden) das AdFL-Fragment ausgeschnitten. a: PstI-M-Fragment (Klon 501); b: PstI-L-Fragment (Klon 511); c: PstI-K-Fragment (Klon 533); d: ni-Fragment (Klon 164); e: PstI-I-Fragment (Klon 543); f: PstI-G-Fragment (Klon 553); g: PstI-E-Fragment (Klon 561); h: PstI-D-Fragment (Klon 276); i: PstI-C- und -D-Fragment (Klon 271); j: PstI-B-Fragment (Klon 252); k: AdFL-DNA PstI-geschnitten; l: pBR322, EcoRI+pBR322, EcoRI.

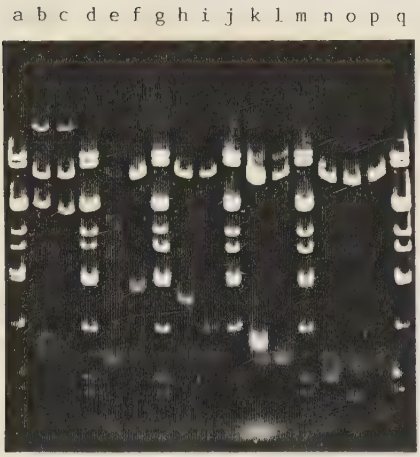


Abb. 4-19

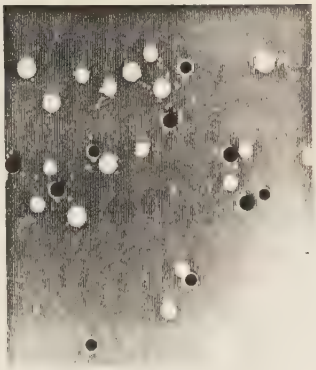


Abb. 4-20

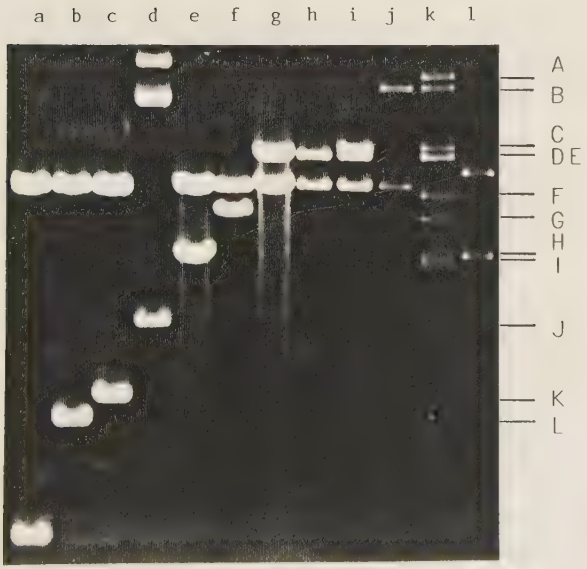


Abb. 4-21

AdFL-PstI-Fragmentgemisch auf einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt, um das PstI-A-Fragment weitgehend frei von Verunreinigungen mit dem PstI-B-Fragment isolieren zu können. Sowohl bei der Klonierung in pUC8 als auch in pBR322 wurde niemals das PstI-A-Fragment gefunden (vgl. Tab. 4-3: Klone mit 1900er-Nummern). Von den 30 untersuchten pUC8-Klonen enthielten 26 das B-Fragment, ein einziger ein kleineres, wahrscheinlich das G-Fragment, und 3 enthielten keinen erkennbaren Einbau.
Über ähnliche Probleme bei der Klonierung von Restriktionsfragmenten viraler DNA, z.B. von Herpes simplex Virus (HSV 1) wurde auch von anderen Autoren berichtet (Post et al., 1980; Goldin et al., 1981)
Ein Teilergebnis konnte schließlich erzielt werden, indem das PstI-A-Fragment mit BamHI nachgeschnitten wurde und die beiden entstandenen Fragmente mit ca. 5,3 % und 11,4 % der AdFL-Genomlänge in pUC8, das mit den selben Enzymen geschnitten worden war, kloniert wurden. Das größere der beiden Fragmente, das sich über den Bereich von 64,2 bis 75,6 der AdFL-Karte erstreckt, konnte auf diese Weise kloniert werden. Aus Schnellaufschlüssen gibt es gute Anhaltspunkte dafür, daß möglicherweise auch das kleinere Fragment als Klon vorhanden ist.

4.6.3 Die Klonierung von terminalen Mausadenovirus-DNA-Fragmenten

Mit der Klonierung der Endfragmente wurden zwei Ziele verfolgt. Neben der Vervollständigung der Virus-Genbank war beabsichtigt, diese Klone bei in-vitro -Replikationsversuchen einzusetzen. Der Startpunkt der DNA-Replikation wurde schon seit längerer Zeit innerhalb der umgekehrten terminalen Repetition an den beiden Enden des linearen DNA-Moleküls vermutet (Winnacker, 1978; Temple et al., 1981) und konnte inzwischen weiter eingeengt werden. Im Ad2/Ad5-System liegt der für die Initiation der Replikation unbedingt erforderliche Erkennungsbereich innerhalb der ersten 19 bis 21 Basenpaare vom Ende entfernt (Stillman, 1982a; van Bergen,

1983b; Pearson, 1983; Lally et al, in Druck, 1984; Gröger, W. und Dörper, T., pers. Mitteilung). Von Interesse war deshalb, ob sich die in vivo gewonnenen Ergebnisse über die Replikation im 3T3- und HeLa-System sowohl mit viraler DNA als auch mit Endfragmenten in vitro nachvollziehen ließen. Außerdem war geplant, Mausadenovirus eventuell zum eukaryotischen Vektorsystem auszubauen.

Die Klonierung der Endfragmente von Adenoviren im allgemeinen und damit auch von Mausadenovirus unterscheidet sich von der Klonierung interner Fragmente in zweierlei Hinsicht.

1. Das Ende ist glatt, d.h. doppelsträngig bis zur letzten Base und nicht über mehrere Basen einzelsträngig, wie an vielen Restriktionsschnittstellen. PstI beispielsweise erzeugt ein 4 Basen langes vorspringendes 3'-Ende. Eine Ligierung an glatten Enden geht zwar schlechter als an überlappenden Einzelsträngen, ist aber im allgemeinen problemlos.

2. An beiden 5'-Enden der viralen DNA ist je ein Molekül des terminalen Proteins kovalent gebunden (Robinson und Bellet, 1973, 1974; Rekosh, 1977; Stillman und Bellet, 1979). Es hat in Ad2 ein Molekulargewicht von 55000 Dalton (Challberg, 1981). Die Verknüpfung besteht über eine Phosphodiester-Bindung zwischen der ß-Hydroxylgruppe eines Serinrestes des Proteins und dem 5'-Hydroxylrest des terminalen Desoxycytidinrestes des DNA-Moleküls (Desiderio 1981). Auch nach extensiver proteolytischer Spaltung mit Proteinase K ist das terminale Cytidin weder einer radioaktiven Markierung durch Polynukleotid-Kinase (Carusi, 1977) noch einer Ligierung mit einer anderen DNA durch T4-Ligase zuganglich. Das kann aber durch eine Behandlung der DNA mit Natronlauge oder Piperidin erreicht werden (Carusi, 1977; Stillman, 1982). Schon früher war in unserem Labor (Meinschad, C., Lally, C. und Groger, W.) festgestellt worden, daß lange DNA-Schwänze an den Enden klonierter Endfragmente, wie sie z.B. durch ein GC-Tailing zustande kommen können (gezeigt fur 21-GC-Reste; Gröger, W., pers. Mitteilung), bei einer in-vitro-Replikation hinderlich sind. Das Endfragment sollte deshalb so in einen Vektor eingebaut werden, daß es durch

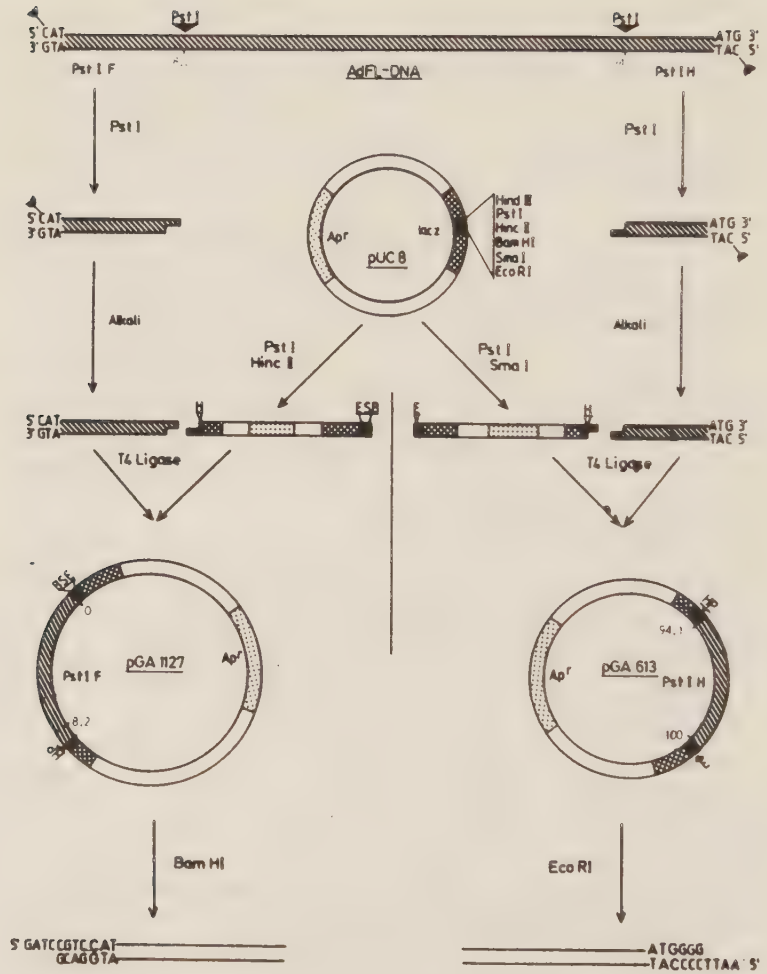


Abb. 4.22: Strategie der Klonierung terminaler AdFL-DNA-Fragmente (PstI F und PstI H) von Mausadenovirus FL (Erklärung im Text). Die Restriktionsschnittstellen der Polylinkerregion sind mit großen Buchstaben abgekürzt: E = EcoRI; S = SalI; B = BamHI; H = HindIII; P = PstI. Für in-vitro-Replikationsversuche (Lally et al., 1984; Lally, 1984) wurden die Plasmide mit EcoRI (Klon pGA 613; PstI-H-Fragment) oder BamHI (pGA 1127; PstI-F-Fragment) möglichst nahe an den Enden der viralen Fragmente geöffnet.

Restriktionsenzyme moglichst exakt am Ende wieder linearisierbar ist. Als Klonierungsvektor erschien für diesen Zweck pUC8 wegen seiner Polylinkerregion besonders geeignet. Zum besseren Verständnis wurde die Strategie der Endfragmentklonierung in Abbildung 4-22 am Beispiel des Einbaus des PstI-H-Fragmentes in die SmaI/PstI-Schnittstellen (Klon 613) und des PstI-F-Fragmentes in die HincII/PstI-Schnittstellen des pUC8-Vektors (Klon 1127) dargestellt. Der Vektor wurde mit PstI linearisiert und weitergeschnitten mit SmaI oder HincII (vgl. Abb. 4-22). Beide Enzyme erzeugen die benötigten glatten Enden. Nach dem Einbau eines Endfragments sollte es damit möglich sein, im Falle eines PstI/SmaI-geschnittenen Vektors das Molekül an der benachbarten EcoRI-Schnittstelle zu linearisieren, im Falle des PstI/HincII-geschnittenen Vektors an der nahen BamHI-Schnittstelle. Um die Ligasereaktion zu erleichtern, wurde der Vektor an der glatten Schnittstelle nicht mit Phosphatase behandelt. Das Risiko, unerwünschte rekombinante Plasmide zu erhalten - zu rechnen war vor allem mit Kopf-an-Kopf-Dimeren des Vektors -, wurde in Kauf genommen. Das sehr kleine Fragment, das bei der Doppelverdauung des Vektors entstand, wurde durch Säulenchromatographie über ein Sephadex G 50 Molekularsieb vom Vektor abgetrennt (Näheres im Methodenteil 3.7.2). Die Klone des rechten Endfragments konnten durch Schnellaufschlüsse (Klon 831) oder Southernblot-Hybridisierung (Klon 613; vgl. 4.7.2) identifiziert und charakterisiert werden. Die Klonierung des PstI-Fragments vom linken Ende des Genoms war so ineffizient, daß man zunächst durch eine Koloniehybridisierung die rekombinanten Plasmide auswählen mußte (4.7.1).

4.7 Identifizierung und Kartierung klonierter AdFL-Restriktionsfragmente

4.7.1. Identifizierung rekombinanter Plasmide durch Kolonie-Hybridisierung

Die Suche nach dem linken Endfragment aus einigen hundert Klonen erwies sich nach einigen Schnellaufschlußserien als hoffnungslos. Aus diesem Grunde wurde eine Methode angewandt, mit der sich in kurzer Zeit eine größere Anzahl von Kolonien untersuchen läßt.
Alle weißen Kolonien (vgl. 4.6.3) wurden auf neue Agarplatten in einem Rechteckmuster überimpft (replica plating), von dort auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit radioaktiv markierter AdFL-Gesamt-DNA hybridisiert (Grunstein und Hognes, 1975; Grunstein und Wallis, 1979) Eine Hybridisierung und damit intensive Schwärzung des Röntgenfilms sollte nur an den Stellen erfolgen, an denen die Bakterienkolonie ein Stück AdFL-DNA aufgenommen hat. Kolonien, die pUC8-Dimere enthielten oder durch andere Mechanismen pUC-Plasmide mit defekter lac-Z-Region aufgenommen hatten und deshalb auf der X-Gal-Agarplatte weiß waren, sollten keine Schwärzung auf dem Röntgenfilm erzeugen. Kolonien, die nach dieser Untersuchung einen Einbau viraler DNA vermuten ließen, wurden von einem Duplikat der Stammplatte in 5 ml Medium mit Ampicillin angeimpft und wie üblich durch Schnellaufschlüsse (3.9.1) weiter analysiert. Von insgesamt etwa 500 Bakterienkolonien wurden nach den Autoradiographien 34 ausgewählt. Von diesen enthielten drei das gesuchte PstI-F-Fragment vom linken Ende (Klon 1126, 1127 und 1128; vgl. Tab. 4-3) und weitere fünf Klone das PstI-H-Fragment vom rechten Ende des Genoms (1130, 1131, 1135, 1113, 1116). Außerdem wurden eine Reihe anderer Fragmente , möglicherweise auch einige ni-Fragmente gefunden, die jedoch nicht näher charakterisiert wurden. Abbildung 4-23 zeigt das Autoradiogramm einer solchen Koloniehybridisierung. Mit einem schwarzen Pfeil sind diejenigen

Kolonien gekennzeichnet, die durch Schnellaufschlüsse weiter charakterisiert wurden, mit weißem Pfeil die einzigen drei Kolonien, die das AdFL-PstI-F-Fragment enthielten. Bei der Klonierung des linken Endfragmentes ergaben sich einige Besonderheiten:

- Die drei gefundenen Klone zeigten auf der X-Gal-Agar-Stammplatte einen sowohl von weißen als auch von blauen Kolonien deutlich unterscheidbaren hellblauen Farbton; d.h., das lac-Z-Gen scheint teilweise aktiv zu sein.
- Unter den Kolonien, in denen das gereinigte PstI-Fragment kloniert worden war, befanden sich mehr (5) PstI-H-Klone als PstI-F-Klone. Das kann bedeuten, daß das rechte Endfragment leichter klonierbar ist als das linke, oder aber, daß das linke Ende zwar häufig eingebaut wurde, wegen der atypischen Färbung der Klone jedoch der Suche entgangen ist. Eine Entscheidung darüber ist nicht mehr möglich, da die Stammplatten nach dem Überimpfen vernichtet wurden. Das Auftauchen von PstI-H-Klonen unter den PstI-F-Klonen ist allein schon verwunderlich, aber erklärbar. Die Fragmente wurden zwar über die Gelelektrophorese gereinigt, enthalten aber immer noch geringe Mengen anderer Fragmente. Bei der Klonierungsmethode wird dann durch das Anbieten des doppelt geschnittenen Vektors mit einem glatten Ende und einer PstI-Schnittstelle auf Fragmente selektioniert, die die gleichen Eigenschaften zeigen, also auf die Endfragmente. Daß auch noch andere (interne) Fragmente gefunden wurden, ist darauf zurückzuführen, daß kleinste Mengen des Vektors der Nachverdauung mit SmaI bzw. HincII entgangen sind und damit Verunreinigungen mit internen AdFL-Fragmenten, die sich unter den isolierten Endfragmenten befanden, aufnehmen konnten.

4.7.2 Identifizierung von Klonen durch Hybridisierung nach Southern (Southern, 1975)

Diejenigen klonierten Fragmente, deren Zuordnung anhand von Restriktionsverdauungen unklar war, wurden durch Southernblot-Hybridisierungen analysiert. Dazu wurde Mausadenovirus-DNA oder auch zelluläre DNA aus 3T3-Zellen mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit der ^{32}P-markierten unbekannten DNA-Probe hybridisiert. Da keine Mengenprobleme zu erwarten waren, genügte bei diesen Versuchen eine geringe Radioaktivität (10^4-10^6 cpm) der Hybridisierungsprobe. Auf diese Weise wurden zu verschiedenen Zeitpunkten DNA-Proben analysiert. Die wichtigsten Ergebnisse sollen an dieser Stelle gemeinsam dargestellt werden, obwohl die Experimente keinen gemeinsamen Bezug zueinander haben.

1. Einige rekombinante Plasmide, die bei der Klonierung von Endfragmenten gefunden worden waren, wurden durch Southernblot-Hybridisierung analysiert. Abbildung 4-24 zeigt zwei Beispiele. Neben der Fotografie des ethidiumbromidgefärbten Gels ist im gleichen Maßstab das Autoradiogramm des Filters abgebildet. Der hybridisierende Bereich wird anhand der Restriktionskarten von AdFL für die verwendeten Enzyme eingegrenzt. So konnte gezeigt werden, daß Klon 613 tatsächlich das PstI-H-Fragment vom rechten Ende des Virusgenoms enthielt. Klon 615 enthielt, wie noch einige weitere Klone, das PstI-G-Fragment.

2. In gleicher Weise wurde Klon 271 analysiert. Er war mit einem Einbau von über 20 % der AdFL-Gesamtlänge als "Riesenklon" aus der Klonierung der gemeinsam gereinigten PstI-CDE-Fragmente hervorgegangen. Die Klon-271-DNA hybridisierte an das HindIII-A-Fragment zu 0-41,1 %, an das XhoI-C-Fragment zu 16,6-32 %, an die im Gel nicht getrennten Fragmente E und F (E: 8,7-16,6 %; F: 38,2-58,2 %) und schwach an das Xho-I-G-Fragment (32,0-38,2 %), ferner an den PstI-CDE-Fragmentblock. Nach diesen Daten

(Southernblot wurde nicht abgebildet) enthält Klon 271 das PstI-C- (13,9-24,7 %) und -D-Fragment (36-46,1 %). Das PstI-E-Fragment (48,7-58,9 %) liegt außerhalb des hybridisierenden Bereichs. Orientierung und Lage der Fragmente zueinander konnten später durch Restriktionsanalysen wie folgt bestimmt werden: (pUC8)-EcoRI, PstI ---- $\overleftarrow{\text{AdFL PstI C}}$ ---- $\overleftarrow{\text{AdFL PstI D}}$ ---- PstI, HindIII (pUC8)

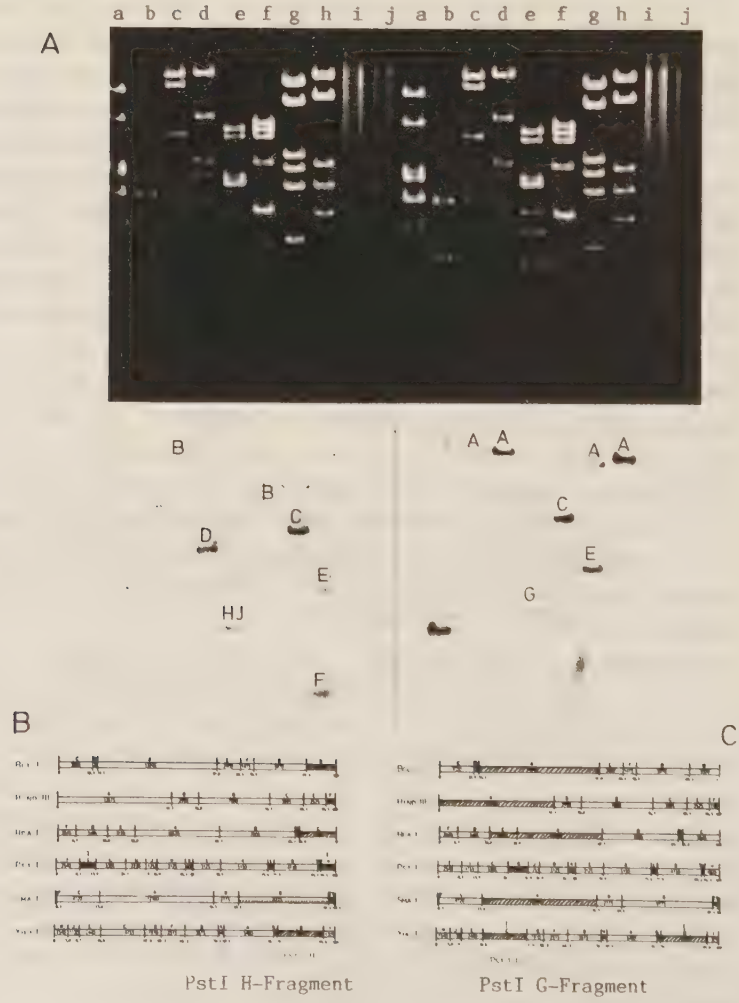
3. Das kleinste der AdFL-PstI-Fragmente, das PstI-M-Fragment, läßt sich von keinem der bei der AdFL-Kartierung verwendeten Restriktionsenzyme schneiden. Eine Lokalisierung in der PstI-Karte war deshalb nur durch eine aufwendige Nachverdauung gereinigter Fragmente möglich, oder aber - einfacher und schneller - durch Hybridisierung. Klon 501, der das Fragment in pUC7 eingebaut enthält, wurde als Hybridisierungsprobe benutzt. Auf dem Blot wurden die XhoI-B-Bande zwischen 79,2 und 95,8 % und die HindIII-E-Bande zwischen 88,3 und 96,5 % des Virus-Genoms markiert. Damit kommt als einzig mögliche Position des PstI-M-Fragmentes die PstI-Schnittstelle zwischen dem PstI-B- und dem PstI-H-Fragment bei Position 94,1 % in Frage.

Abb. 4-23: Koloniehybridisierung nach Grunstein und Hogness, 1975. Kolonien, die rekombinante Plasmide aufgenommen haben, hybridisieren mit AdFL-DNA und sind deshalb auf dem Röntgenfilm als schwarze Punkte erkennbar. Mit Pfeilen wurden die Kolonien gekennzeichnet, die das PstI-F-Fragment trugen (pGA 1126, 1127, 1128).

Abb. 4-24: Charakterisierung rekombinanter Plasmide durch Southernblot-Hybridisierungen (Southern, 1975). AdFL-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem Agarosegel (siehe Figur A) aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Radioaktiv markierte Plasmid-DNA aus nicht charakterisierten Klonen wurde an die Blots hybridisiert. Ein Vergleich der hybridisierenden Banden mit der Restriktionskarte von AdFL ergibt, daß Klon 613 das PstI-H-Fragment (Figur B) und Klon 615 das PstI-G-Fragment (Figur C) aufgenommen haben.
a: Ad2 HindIII; b: pBR322 EcoRI/EcoRII; c: AdFL SmaI; d: AdFL BglI; e: PstI; f: XhoI; g: HpaI; h: HindIII; i: 3T3-DNA uninfiziert; j: 3T3-DNA inf. mit AdFL - HindIII

Abb. 4-23

Abb. 4-24



4. Einige der ni-Plasmid-Klone in pBR322 (vgl. 4.6.1) wurden gegen PstI-Verdauungen viraler und zellulärer DNA hybridisiert. Während keine spezifische Bindung an Zell-DNA beobachtet werden konnte, hybridisierten sie an verschiedene AdFL-PstI-Fragmente. Die ni-Plasmide scheinen also Bruchstücke viraler PstI-Fragmente zu enthalten. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind bereits in der Aufstellung der 100er-Klone in Tabelle 4-2 zusammengefaßt. So bindet beispielsweise Klon 143/II an das PstI-B-Fragment von AdFL, Klon 169/I an das PstI-F-Fragment. Da Klone gefunden wurden, die an zwei Fragmente binden (162/I an PstI DE und PstI L, 148/II an PstI DE und PstI G), muß man Rekombinationsereignisse zwischen nicht benachbarten Fragmenten annehmen. Dies steht mit der Vorstellung in Einklang, es könnte sich dabei um Fragmente aus inkompletten Partikeln handeln.

4.7.3 Kartierung von AdFL-PstI-Klonen

Eine ausführliche Beschreibung der Kartierung im Text würde zu weit führen. Ich möchte mich deshalb auf einige allgemeine Hinweise beschränken und im übrigen auf die Abbildungen 4-25 bis 4-34 hinweisen, in welchen die wichtigsten Gele der Kartierung gezeigt sind. Den zeichnerischen Darstellungen der Ergebnisse in den Abbildungen 4-36 bis 4-46 kann auch in groben Zügen die Kartierungsstrategie entnommen werden: Dort sind die in den Restriktionsverdauungen vorgefundenen Fragmentgroßen dargestellt. Je nach Situation wurde die symmetrische Anordnung vieler Schnittstellen in den pUC7-Klonen oder die asymmetrische Anordnung in den pUC8- oder pBR322-Klonen ausgenutzt, um in Verdauungen mit 1-3 Restriktionsenzymen die Lage der Schnittstellen innerhalb der Fragmente exakt zu bestimmen. Als Großenmarker wurde auf vielen Gelen mit EcoRII geschnittenes und mit EcoRI linearisiertes pBR322, meist mehrmals, aufgetragen. Von pBR322 sind die Fragmentgroßen durch Sequenzierung der DNA genau bekannt (Sutcliffe, 1979). Noch haufiger wurde PstI-geschnittene AdFL-DNA als Marker aufgetragen, deren genaue Fragmentgroßen in eigenen

Abb. 4-25 bis 4-45: Agarosegele zur Kartierung von AdFL-PstI-Klonen.
Dargestellt sind nur die wichtigsten Gele, mit deren Hilfe die Kartierung und Charakterisierung der AdFL-PstI-Klone durchgeführt wurde. Die Daten aus ergänzenden Gelen wurden in den graphischen Darstellungen der Abb. 4-35 bis 4-45 mit aufgenommen.

Abb. 4-25: Agarosegel zur Kartierung von Klon 1701, der den größeren Teil des PstI-A-Fragmentes (bis zur BamHI-Schnittstelle (Position 64,2)) enthält. Reihen a und l: AdFL-PstI-Marker; b:Fragment linearisiert mit BamHI; c: linearisiert mit PstI; d: ausgeschnitten mit PstI und BamHI; e: XbaI, PstI; f: SmaI, PstI; g: BglI, PstI; h: BglI; i: AccI, PstI; j: SstII, PstI; k: NcoI, PstI.

Abb. 4-26: Agarosegel zur Kartierug des AdFL-PstI-B-Fragments (Klon 252).
Reihen a, n, s, x: AdFL-PstI-Marker; b; ungeschnitten; c: KpnI, PstI (KpnI hat nicht geschnitten); d: BglI, PstI; e: HindIII, PstI; f: SstII, PstI; g: HpaI, PstI; h: BalI, PstI; i: XbaI, PstI; j: AccI, PstI; k: SstI; l: SstI, PstI; m: EcoRI, PstI; o: EcoRI, XbaI; p: XhoI, XbaI; q: XhoI, PstI; r: PstI; t: HindIII; u: BglI; v: AccI; w: NcoI, PstI.

Abb. 4-27: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-C-Fragments (Klon 224).
Reihen a, o, v: AdFL-PstI-Marker; b: BclI, XhoI; c: BglI, XhoI; d: PstI, XorII; f: HpaI, PstI; g: XhoI, PstI; h: XbaI, PstI; i: AccI, PstI; j: SalI, PstI; k: SmaI, PstI; l: BglI, PstI; m: NcoI, PstI; n: BglI; p: PstI; q: SmaI; r: SalI; s: AccI; t: BclI (unvollständig); u: XorII (unvollständig).

Abb. 4-28: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-D-Fragments (Klon 276).
Reihen c, r, y: AdFL-PstI-Marker; a: PstI; b: PstI, XbaI; d: PstI, XhoI; e: XhoI, XbaI; f: HindIII; g: PstI, HindIII; h: PstI, KpnI; i: KpnI, EcoRI; j: AdFL KpnI; k: KpnI; l: AccI, KpnI; m: AccI; n: AdFL AccI; o: PstI, AccI; p: AccI, HindIII; q: AccI, XhoI; s: PstI, NcoI (keine NcoI-Schnittstelle); t: HindIII, BstEII; u: HindII, SstI; v: HindIII, SstII; w: XhoI, SstI; x: XhoI, SstII.

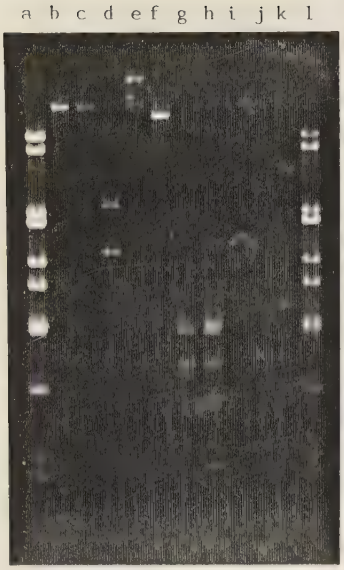


Abb. 4-25

Abb. 4-26

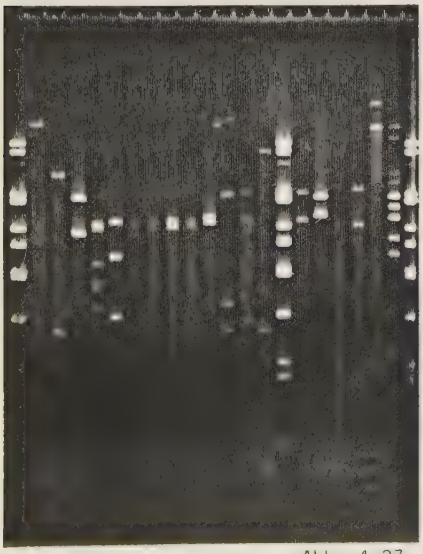


Abb. 4-27

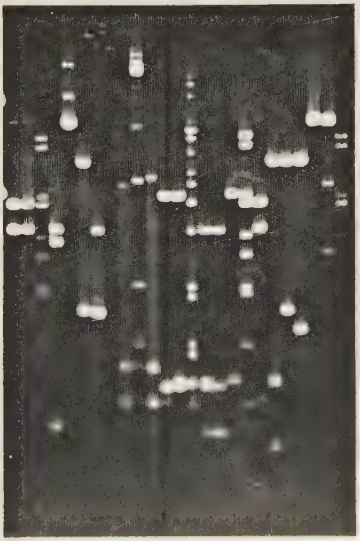


Abb. 4-28

Abb. 4-29: Agarosegel zur Kartierung des PstI-E-fragments (Klon 561, Klon 275).
Reihe a: AdFL-PstI-Marker; b: BglI; c: EcoRI, BglI; d: AccI; e: AccI (Klon 275); f: AccI, EcoRI; g: HindIII, EcoRI; h: XhoI, EcoRI; i: NcoI, EcoRI; j: BalI (unvollständig); k: SmaI, EcoRI; l: XorII, EcoRI (unvollständig); m: BalI, EcoRI (unvollständig).

Abb. 4-30: Agarosegel zur Kartierung des PstI-F-Fragments (Klon 1127 - Fragment vom linken Ende des AdFL-Genoms).
Reihen b, n, y: AdFL-PstI-Marker; a: AdFL, XhoI; c: EcoRI; d: BamHI, EcoRI; e: BglII, EcoRI; f: HpaI, EcoRI; g: HindIII, EcoRI; h: NcoI, EcoRI; i: SalI, EcoRI; j: SmaI, EcoRI; k: SstI, EcoRI; l: XhoI, EcoRI; m: AccI, HindIII; o: BamHI; p: BamHI, HindIII; q: BglII, HindIII; r: HpaI, HindIII; s: NcoI, HindIII; t: AdFL NcoI; u: SalI, HindIII; v: SmaI, HindIII; w: SstI, HindIII; x: XhoI, HindIII.

Abb. 4-31: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-G-Fragments (Klon 553):
Reihen a, m, v: AdFL-PstI-Marker; b: SalI, HpaI; c: SalI; d: SalI, BclI; e: HpaI, PstI; f: HpaI, EcoRI; g: AccI, PstI; h: AccI; i: PstI; j: EcoRI; k: BclI, PstI; l: BclI, EcoRI; n: BamHI, PstI; o: BamHI (unvollständig); p: SstII, PstI; q: SstII, EcoRI; r: XhoI, PstI; s: XhoI, EcoRI; t: NcoI, EcoRI (keine NcoI-Schnittstelle); u: BglI, XhoI.

Abb. 4-32: Agarosegel zur Kartierung des PstI-H-Fragments (Klon 613 - Fragment vom rechten Ende des AdFL-Genoms).
Reihen a, k: AdFL-PstI-Marker; m: pBR322-EcoRII -Marker; b: BamHI; c: PstI; d: EcoRI; e: PstI, EcoRI; f: SphI, EcoRI; g: SstI, EcoRI; h: BstEII, EcoRI; i: XhoI, EcoRI; j: KpnI, EcoRI; l: ungeschnitten; n: HindIII, o: SphI, HindIII; p: SstI, HindIII; q: BstEII, HindIII; r: KpnI, HindIII; s: EcoRI, HindIII; t: SmaI, HindIII; u: XhoI, HindIII.

a b c d e f g h i j k l m

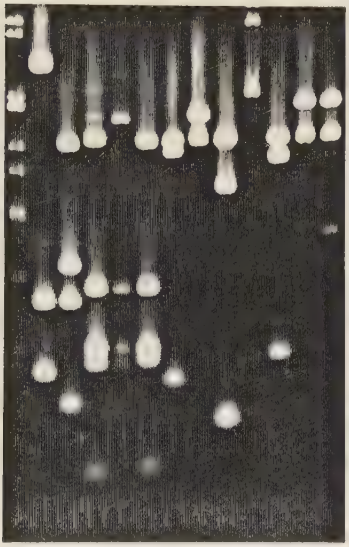


Abb. 4-29

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y

Abb. 4-30

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v

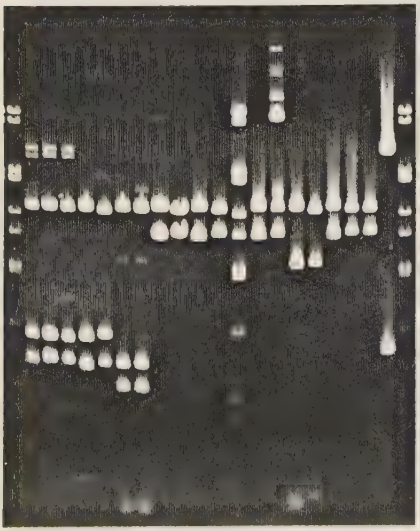


Abb. 4-31

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u

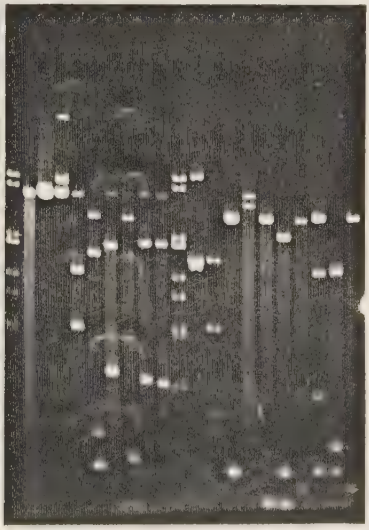


Abb. 4-32

Versuchen bestimmt worden waren (siehe 4.7.5 - Abb. 4-35). Bekanntlich ist der Logarithmus der DNA-Fragmentgröße (in % des Genoms, Molekulargewichts oder der Basenpaare) über einen relativ großen Bereich der Laufstrecke des Fragments auf dem Gel proportional (Maniatis, 1975; Helling et al., 1974). Meist exakte Linearität ergab sich in 1%igen Agarosegelen für den Größenbereich vom AdFL-PstI-J-Fragment mit ca. 1260 bis zum AdFL-PstI-B-Fragment mit etwa 4710 Basenpaaren. Im Bereich größerer und kleinerer Fragmente nimmt die Steigung der Geraden zu. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms. Nach Eingabe der gemessenen Laufstrecken und bekannten Längen der Markerfragmente, die im linearen Bereich lagen, wurde rechnerisch die Eichgerade ermittelt. Aus dieser wurden dann nach Eingabe der Laufstrecken unbekannter Fragmente deren Größe bestimmt. Außerhalb des linearen Bereichs wurde die Eichgerade durch eine 2-Punkte-Eichung festgelegt. Im Extrembereich wurden die Größen aus gezeichneten Eichkurven ermittelt.

Abb. 4-33: Agarosegel zur Kartierung des PstI-I-Fragments (Klon 543).
Reihen a, g, l: AdFL-PstI-Marker; b: BglI; c: BglI, PstI; d: BglI, EcoRI; e: XhoI, PstI; f: XhoI, EcoRI; h: PstI; i: SmaI; j: XorII, EcoRI; k: NcoI, EcoRI.

Abb. 4-34: Agarosegel zur Kartierung des AdFL-PstI-K- und L-Fragments (Klone 533 und 511).
Reihen a, f, k, v: AdFL-PstI-Marker; b bis i: Klon 533 (PstI-K-Fragment); l bis u: Klon 511 (PstI-L-Fragment); b: SalI; c: AccI; d: AccI, PstI; e: PstI; g: XbaI, EcoRI; h: XhoI, EcoRI; i: NcoI, EcoRI (keine NcoI-Schnittstelle); j: BglI, XhoI; l: BglI, HindIII; m: EcoRI, HindIII; n: HindIII, PstI; o: AccI, PstI; p: AccI; q: KpnI, EcoRI (keine Kpn-Schnittstelle); r: KpnI, PstI; s: NcoI, EcoRI (keine NcoI-Schnittstelle); t: PstI; u: EcoRI.

Abb. 4-35: Agarosegel zur Kartierung von AdFL-DNA.
Gereinigte Virus-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Marker: a und j: λ-DNA EcoRI; b und i: λ-DNA HindIII; k: pBR 322 EcoRI/pBR322 EcoRII; l: pBR322 HindI (unvollständig); - c: BclI; d: XhoI; e: HindIII; f: BamHI; g: KpnI; h: PstI; m: AdFL AccI (unvollständig); n: BglI; o: SalI; p: XbaI; q: EcoRI; r: EcoRII; s: HpaI; t: SstI; u: BstEII; v: BglII; w: NcoI; x: PstI.

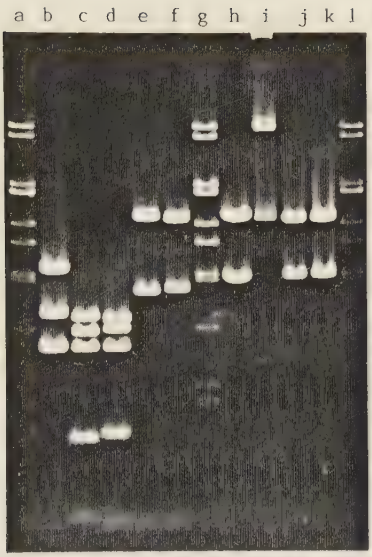


Abb. 4-33

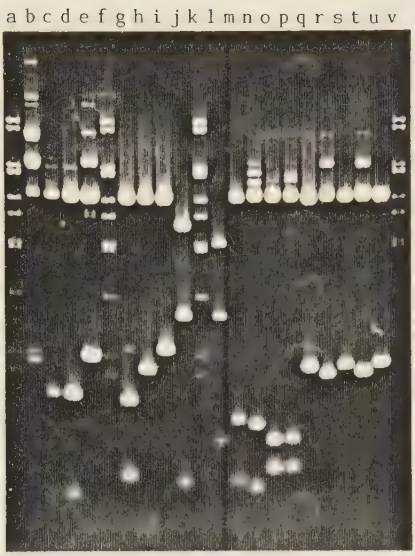


Abb. 4-34

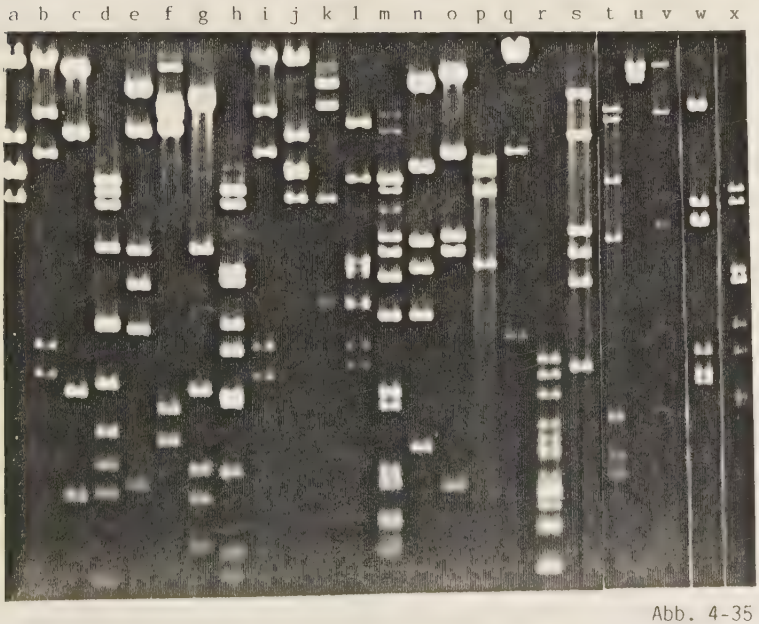


Abb. 4-35

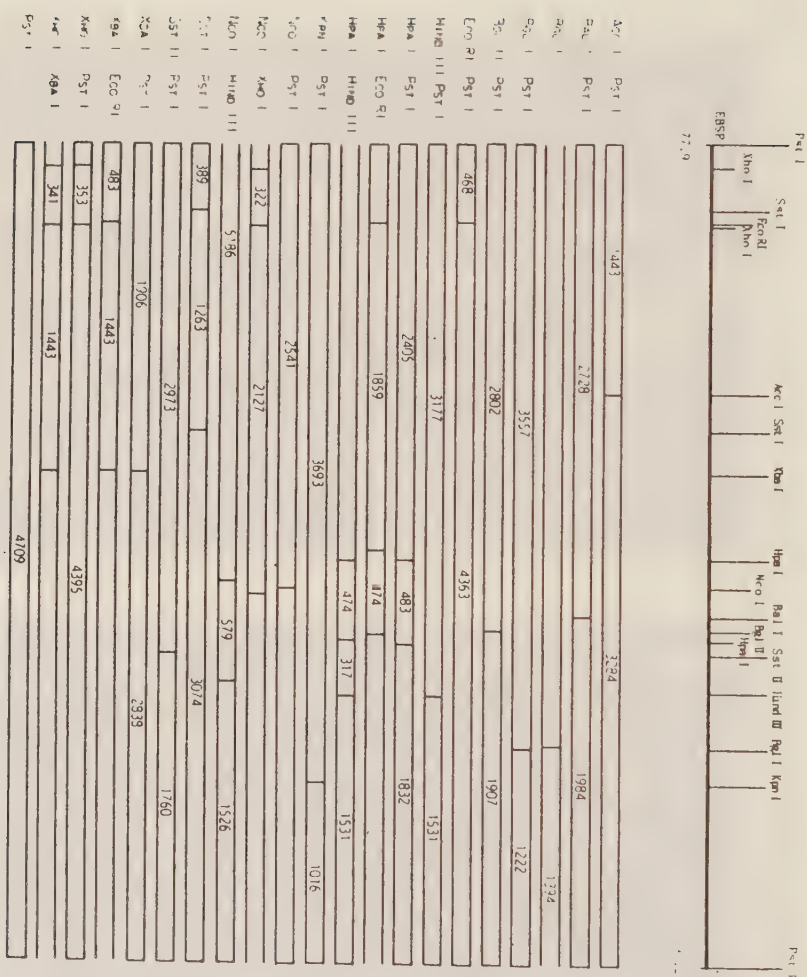
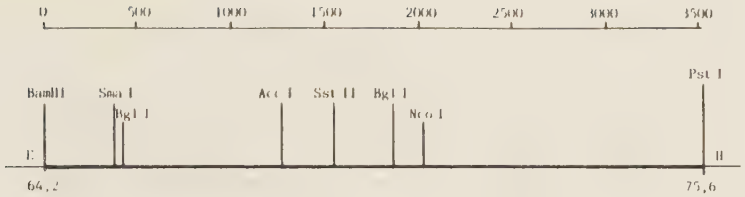


Abb. 4-36: Kartierung der Klone 252 und 256, die das AdFL-PstI-B-Fragment enthalten



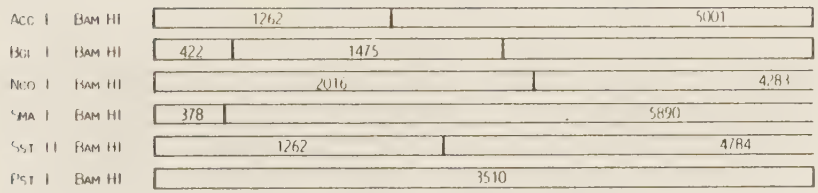
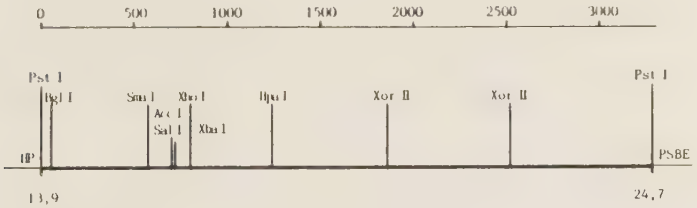


Abb. 4-37: Restriktionskarte von Klon 1701, der die rechte Hälfte des PstI-A-Fragments zwischen der BamHI- (64,2) und der PstI-Schnittstelle (75,6) enthält



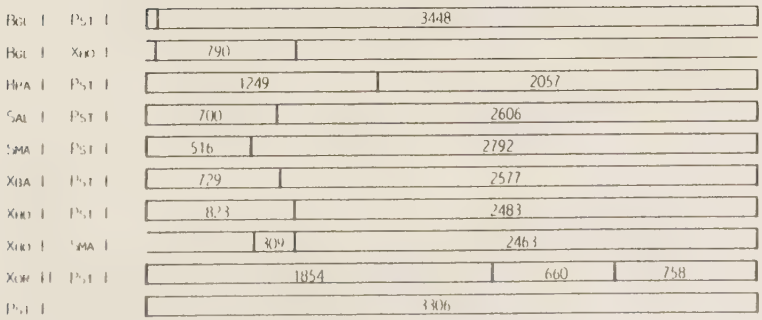


Abb. 4-38: Kartierung von Klon 224, der das AdFL-PstI-C-Fragment enthält

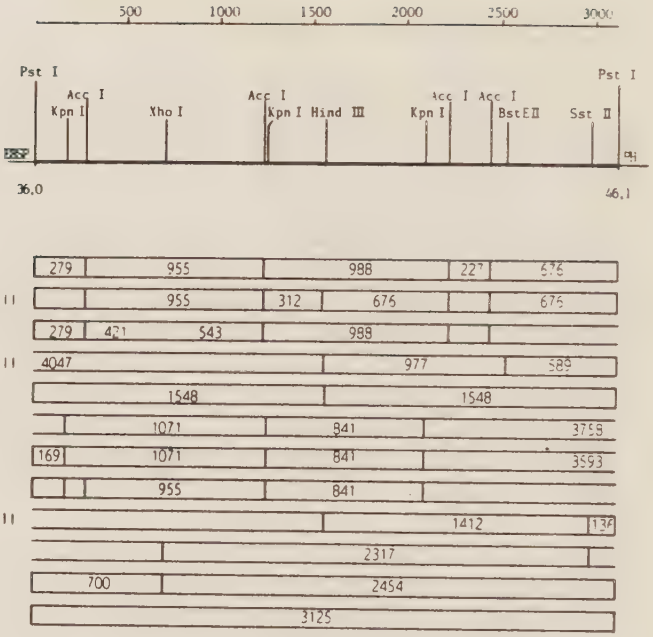
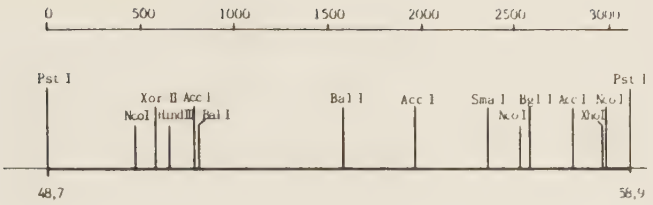


Abb. 4-39: Kartierung von Klon 276 mit AdFL-PstI-D-Fragment



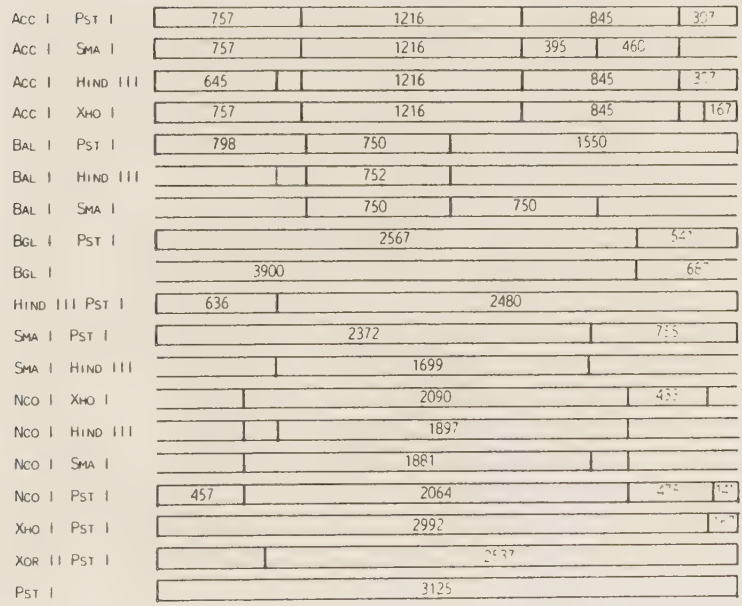
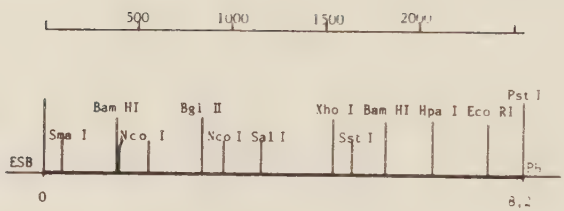


Abb. 4-40: Kartierung der Klone 154 (pBR322) und 561 (pUC7), die das AdFL-Pst-E-Fragment enthalten.

Seite 114:

Abb. 4-41: Kartierung von Klon 1127, der das PstI-F-Fragment vom linken Ende des AdFL-Genoms enthält

Abb. 4-42: Kartierung von Klon 553 (pUC7), der das AdFL-PstI-G-Fragment



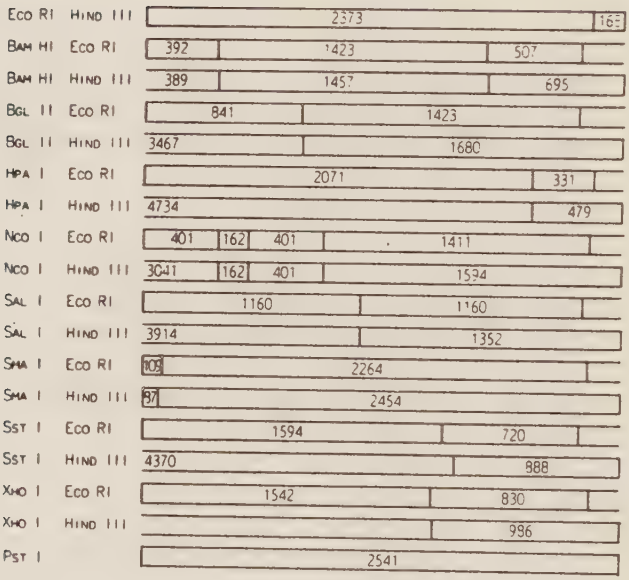
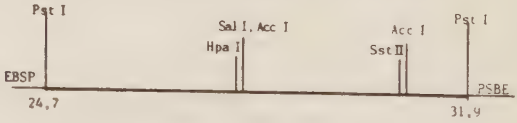


Abb. 4-41



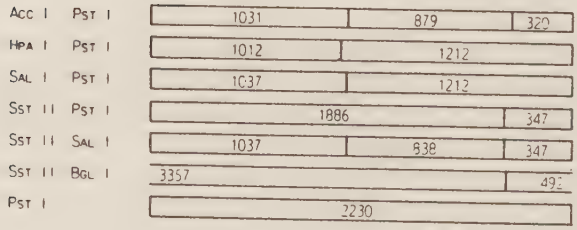
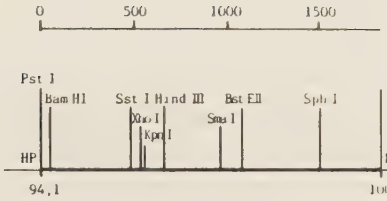


Abb. 4-42



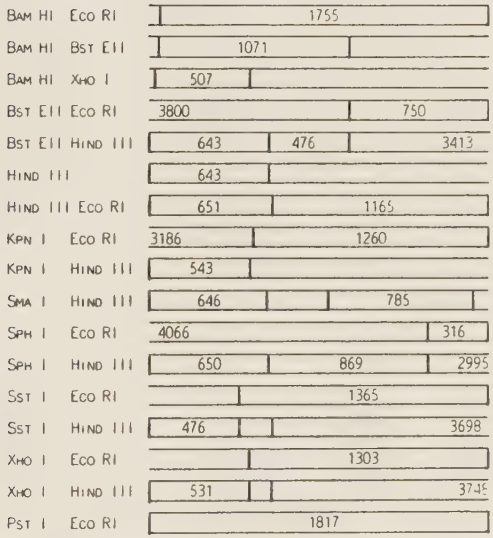
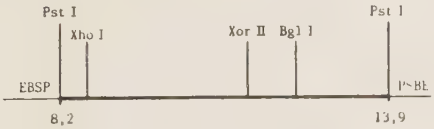


Abb. 4-43: Kartierung von Klon 613 (pUC8), der das PstI-H-Fragment vom rechten Ende des AdFL-Genoms enthält



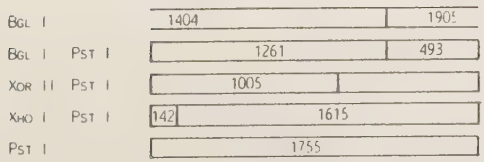


Abb. 4-44: Kartierung des AdFL-PstI-I-Fragments (Klon 543-pUC7)

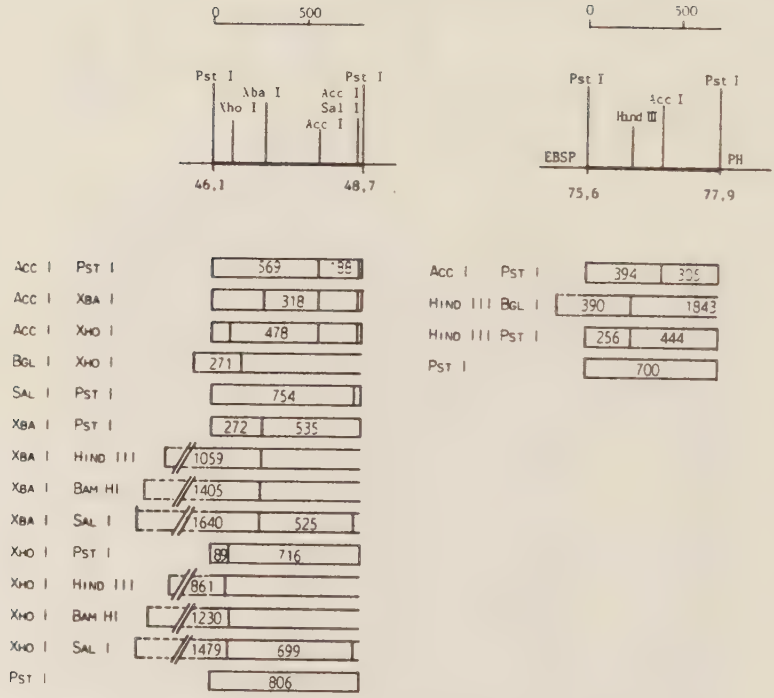


Abb. 4-45 (links): Kartierung der Klone 145 (pBR322) und 533 (pUC7), die das AdFL-PstI-K-Fragment enthalten

Abb. 4-46 (rechts): Kartierung von Klon 511 (pUC7), der das PstI-L-Fragment enthält

4.7.4 Sequenzierung klonierter AdFL-Endfragmente

Vor dem Einsatz klonierter Endfragmente in ein in-vitro-Replikationssystem sollte durch Sequenzierung überprüft werden, ob die Fragmente auch wirklich vollständig in die Vektoren integriert worden sind. Zudem wurde damit ermöglicht, die bereits veröffentlichte DNA-Sequenz der Molekülenden (Temple et al., 1981) noch einmal zu überprüfen. Damals wurde von der HpaII-(SmaI-)Schnittstelle, die 93 Basenpaare vom Ende entfernt liegt

und damit gleichzeitig das Ende der umgekehrten terminalen Repetition darstellt, nach außen zu den DNA-Enden sequenziert. Eine Sequenzierung des zweiten Stranges war nicht möglich, da das 5'-Ende durch die Reste des terminalen Proteins blockiert und damit der Kinasereaktion nicht zugänglich war (vgl. Temple et al., 1981 und meine eigene Diplomarbeit, 1979). In den klonierten Endfragmenten war jedoch das "echte Molekülende" des AdFL-Genoms durch die nahegelegenen Restriktionsschnittstellen des Polylinkers gut für eine ^{32}P-Markierung des 5'-Endes zugänglich. Die Strategie für die Sequenzierung der Klone 613 (PstI-H-Fragment in pUC8 SmaI/PstI) und 1127 (PstI-F-Fragment in pUC8 HincII/PstI) soll in Abbildung 4-47 veranschaulicht werden. Mit der gleichen Strategie wie Klon 613 wurde Klon 831 sequenziert. Er enthalt ebenfalls das PstI-H-Fragment, jedoch, wie bei Klon 1127, in pUC8 zwischen die PstI- und HincII-Schnittstelle eingebaut. Weitere Erläuterungenen zur Sequenzierung befinden sich im Methodenteil (3.6.8).

Um einen Überblick darüber zu gewinnen, welche Aktivitäten bei einer Sequenzierung nötig oder sinnvoll sind und mit welchen Ausbeuten in den einzelnen Reaktionsschritten zu rechnen ist, wurde einige Male eine Radioaktivitätsbilanz aufgestellt. Sie soll am Beispiel der Sequenzierung von Klon 831 hier dargestellt werden. Die Radioaktivität eines Aliquots der Probe wurde an jedem entscheidenden Schritt im Szintillationszähler bestimmt und auf die Gesamtprobe hochgerechnet. Damit ist eine Ausbeutenberechnung moglich. Der Aufstellung in Tabelle 4-4 ist zu entnehmen, daß vor der Auftrennung der Proben in den Sequenzgelen noch etwa 2/3 der Anfangsaktivität zur Verfügung stehen. Trägt man in einer Sequenzserie (5 Reaktionen) zusammen 70000 cpm auf, kann man nach einer Exposition von 24 Stunden in einer Kassette mit Verstarkerfolie eine gut auswertbare Autoradiographie erwarten. Natürlich ist es auch möglich, bei verlängerten Expositionszeiten mit sehr viel geringeren Aktivitäten gute Resultate zu erzielen. Die nach allen Reaktionen verbleibenden 244000 cpm von Klon 831 und 190000 cpm von Klon 1127 wurden zweimal nacheinander auf ein 8%iges und einmal auf ein 16%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel

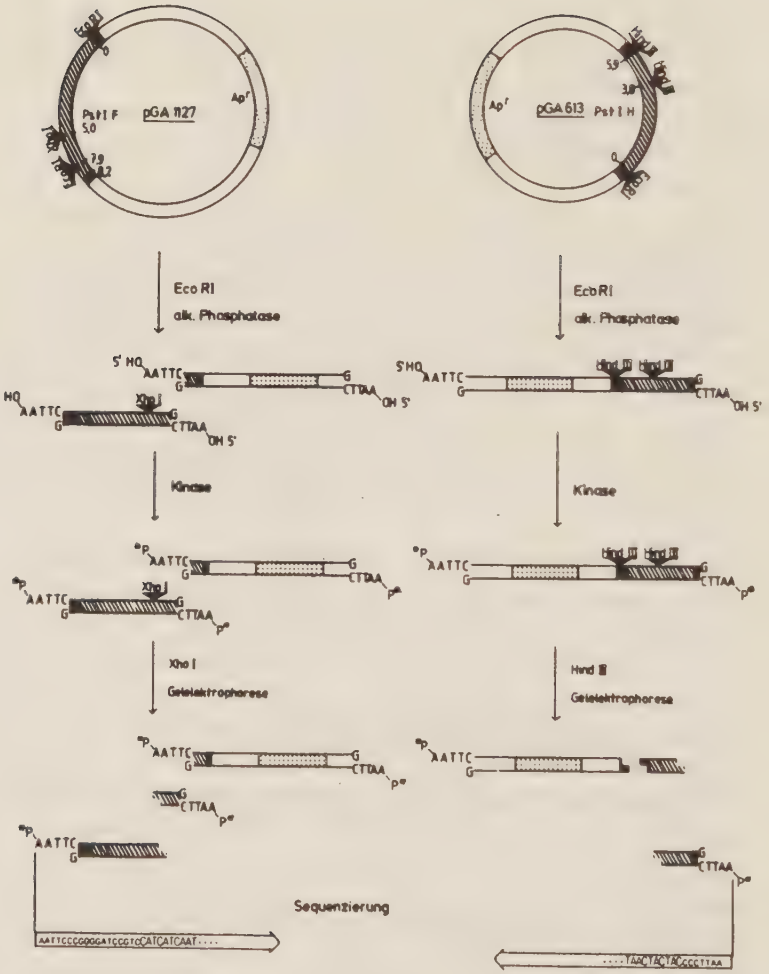


Abb. 4-47: Strategie der Sequenzierung klonierter Endfragmente. Die rekombinanten Plasmide wurden in der Nähe der Termini der AdFL-Fragmente an einer benachbarten Restriktionsschnittstelle der Polylinkerregion (EcoRI) des Vektoranteils linearisiert und radioaktiv markiert. Auf diese Weise läßt sich die Sequenz des Übergangs zwischen der Polylinkerregion und dem AdFL-PstI-Endfragment genau bestimmen.

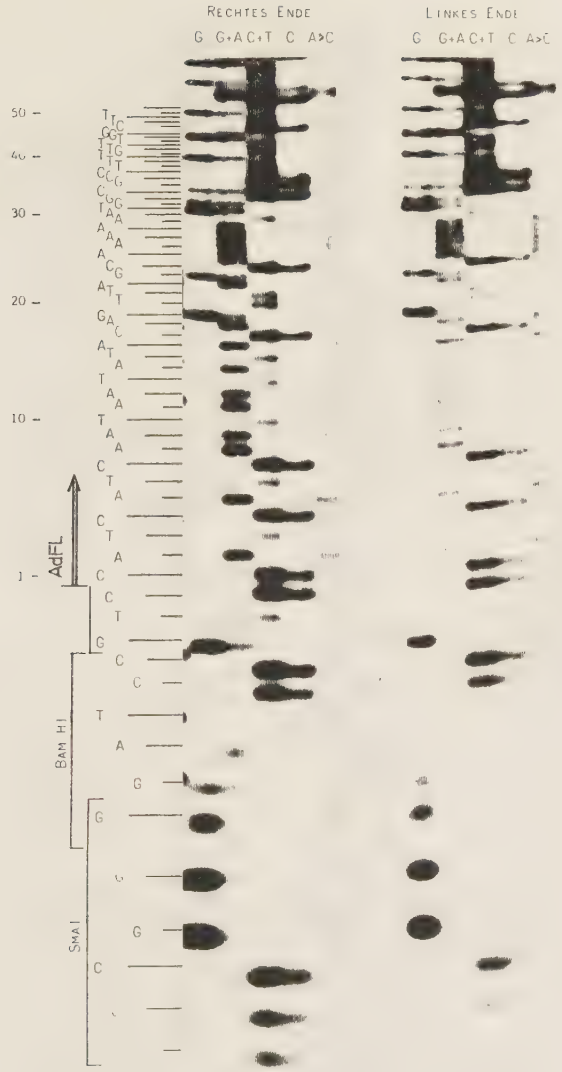


Abb. 4-48: Sequenzierung klonierter Endfragmente. Autoradiographie des 15%igen Sequenzgels.
Sequenz des Übergangs zwischen dem Polylinker von pUC8 und den Enden von AdFL-DNA. Linkes Ende: Klon pGA 1127; rechtes Ende: Klon pGA 831.

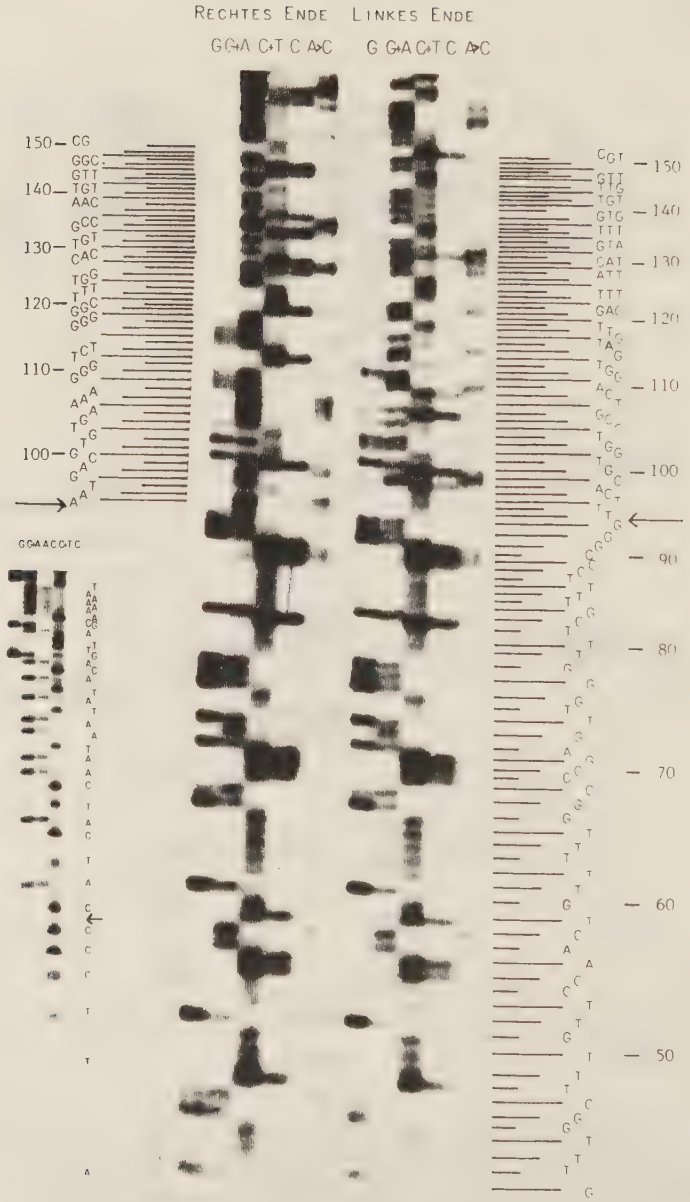


Abb. 4-49

Abb. 4-50

Gegenüberliegende Seite: Sequenzgele

Abb. 4-49: Sequenzierung des rechten Endfragments (Klon pGA 613). Die Autoradiographie des 15%igen Polyacrylamidgels zeigt den Übergang von der Polylinkerregion von pUC8 zum Terminus der AdFL-DNA.

Abb. 4-50: Sequenzierung klonierter Endfragmente.
DNA-Sequenzen der beiden Endfragmente (pGA 1127 und pGA 831) auf einem 8%igen Sequenzgel. Der Pfeil markiert das Ende der terminalen Repetition.

DNA-Probe		Zerfälle (gezählt) (dpm)	Volumen (µl)	Zerfälle (Summe) (dpm)	Verlust (%)	Ausbeute (%)
Fragment nach Kinase (x)		8039	10 aus 900	723500		100
Fragment, nachgeschnitten, und eluiert (xx)		956	1 aus 300	287000	21	79
Sequenzreaktionen nach Piperidin (xxx)	G G	467	1 aus 100			
	G+A	755	1 aus 100			
	A+C	268	1 aus 100			
	C+T	626	1 aus 100			
	C	327	1 aus 100			
	Summe	2443	=1 aus 100	244300	15	67

Sequenzgel	Laufzeit	Laufstrecke BPB	Laufstrecke XC
8 %ig	8 Std.	-	34 cm
	4 Std.	29 cm	15 cm
16 %ig	7 Std.	30 cm	16 cm

Tab. 4-4: Radioaktivitätsbilanz einer Sequenzierung.
(x): Die Radioaktivität wurde nach der Kinasereaktion und nach Zentrifugation über eine mit Sephadex G50 gefüllte Pipettenspitze durch TCA-Fällung bestimmt.
(xx): Das an beiden Enden radioaktiv markierte Fragment wurde mit einem Restriktionsenzym nachgeschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen. Da nur eines der beiden endmarkierten Fragmente eluiert wurde, halbiert sich die gemessene Radioaktivität. Die in den Spalten "Verlust" und "Ausbeute" angegebenen Werte sind jedoch für beide Fragmente umgerechnet.
(xxx): Die radioaktiven Zerfälle wurden zum letzten Mal nach der Piperidinreaktion, dem letzten Schritt vor dem Auftragen auf das Sequenzgel, bestimmt. An diesem Punkt sind bereits alle Äthanolfällungen, bei denen mit größeren Verlusten zu rechnen ist, vorüber.

aufgetragen. In der Tabelle sind auch die Laufzeiten der Gele bei 800 Volt Spannung und die Laufstrecken der Markerfarbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol zusammengefaßt (Tab. 4-4).
Die Sequenzierung ergab, daß die Fragmente genau wie erwartet vollständig in die vorgesehenen Schnittstellen der pUC-Vektoren eingebaut worden waren. Die Abbildungen 4-48 bis 4-50 zeigen die Autoradiographien der Sequenzgele. Die abgelesenen Basen sind seitlich angegeben. Die Sequenz konnte in den drei Gelläufen insgesamt etwa 170 bp vom radioaktiv markierten Ende her abgelesen werden. Abbildung 4-51 zeigt noch einmal zusammenfassend die gefundene Sequenz beider Molekülenden. Sie stimmt innerhalb der terminalen Repetition exakt mit der früher gefundenen überein. Eine Korrektur war allerdings außerhalb der Repetition nötig. In den Positionen 118, 119, 126 und 133 des linken Endes mußten die A- durch G-Reste ersetzt werden.

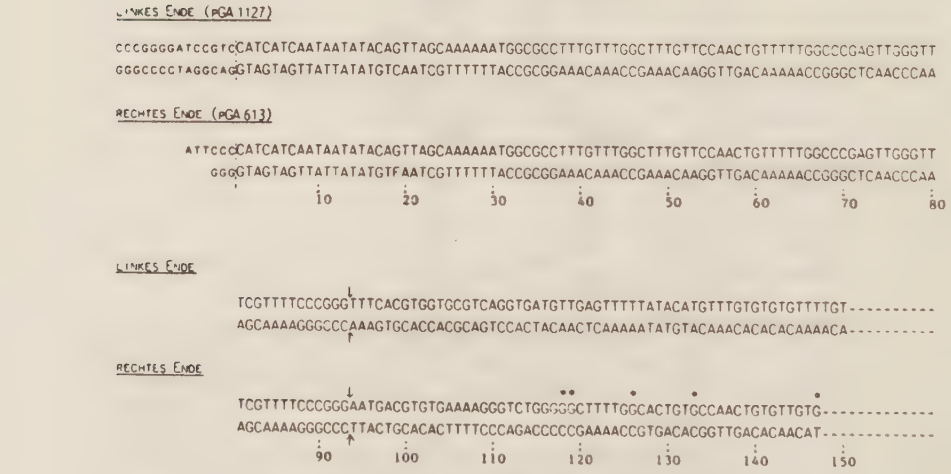


Abb. 4-51: Sequenz der Molekülenden von AdFL-DNA.
Durch die Sequenzierung der klonierten Endfragmente konnte die früher veröffentlichte Sequenz der 93 Basenpaare langen invertierten terminalen Repetition der AdFL-DNA bestätigt werden. Außerhalb der terminalen Repetition des rechten Endes wurden einige Basen korrigiert (markiert mit *).

4.8 Konstruktion einer Restriktionskarte von Mausadenovirus anhand klonierter PstI-Fragmente

AdFL-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und zusammen mit Ad2-DNA, EcoRI- und HindIII-geschnittenem λ-Marker oder mit pBR322, das mit EcoRI linearisiert oder EcoRII geschnitten worden war, auf Agarosegelen aufgetrennt (Abb. 4-35). Die Größenbestimmung von Fragmenten, die länger als ca. 5000 bp (15 % AdFL-Genomlänge) waren, erfolgte mit den selben Markern auf 0,6%igen Agarose-Flachgelen. Die Größe von pBR322 ebenso wie die Länge der λ-Fragmente sind durch Sequenzierung bekannt (pBR322: Sutcliffe, 1978, 1979; Lambda: Sanger et al., 1982).

Die Summe aller Fragmente aus den verschiedenen Verdauungen ergab eine Durchschnittsgröße für das AdFL-Genom von 30890 Basenpaaren. Mit der größten errechneten Summe von 31158 und der kleinsten von 30420 Basenpaaren ergibt sich eine Abweichung von maximal 1,5 % vom Mittelwert. Die Größe der ungeschnittenen AdFL-DNA wurde aus dem 0,6%igen Gel mit 32140 bp bestimmt. Da die Berechnung sehr langer DNA-Moleküle aber wegen der logarithmischen Beziehung mit einem relativ großen Fehler behaftet ist (ein Vermessen von nur 1 mm bezogen auf die Originalgröße des Gels ergäbe eine Reduzierung des Gesamtgenoms auf 30480 bp, was einer Abweichung von 5,4 % entspricht), wurde dem Durchschnittswert für alle weiteren Bestimmungen der Vorrang gegeben.

Die Daten aus den AdFL-DNA-Verdauungen wurden zusammen mit den Restriktionsanalysen der klonierten Fragmente für eine Neukartierung des Gesamtgenoms verwendet. Bei Abweichungen wurden meist die Ergebnisse aus den Kartierungen der Klone bevorzugt. Die Schnittstellen der beiden nicht klonierten Fragmente PstI A und PstI J wurden mit Hilfe der Virusfragmente von den benachbarten Fragmenten her ausgemittelt. Abbildung 4-52 zeigt die neue Restriktionskarte für Mausadenovirus. Zum Vergleich ist auch noch einmal die ältere Karte von Larsen und Nathans (1979) abgebildet.

Bei der Konstruktion der AdFL-Restriktionskarte wurde die von Larsen et al. (1979) vorgeschlagene Orientierung übernommen und

nicht die von Larsen (1977) eingeführte und von Temple (1981) erneut geforderte spiegelbildliche Anordnung. Die ursprüngliche Orientierung basierte auf der asymmetrischen Verteilung der AT-Basenpaare, wobei das AT-reiche Ende per definitionem das rechte Ende sein soll (Sharp, 1977). Die neuere Anordnung (Larsen, 1979) beruht auf einer Bestimmung der genetischen Organisation von AdFL im Vergleich zu menschlichen Adenoviren. Eine endgültige Entscheidung wäre nur durch eine Transkriptionskartierung möglich.

Wesentliche Veränderungen gegenüber der älteren Karte von Larsen et al. ergaben sich in der PstI- und AccI-Karte der AdFL-DNA. Die AccI-Fragmente wurden teilweise in ihrer Lage zueinander verändert, und eine Reihe bisher nicht kartierter Fragmente konnte lokalisiert werden. In der PstI-Karte wurde die Lage des M-, K- und E-Fragments bestimmt und die des G- und J-Fragments mußten vertauscht werden. Ferner war es möglich die Lage einiger kleinerer Fragmente, wie z.B. des HpaI-G- und des XhoI-C-Fragments zu bestimmen. Die Reihenfolge der Fragmente G und E in der NcoI-Karte muß zunächst noch offen bleiben, da die ausschlaggebende Schnittstelle in einem der nicht klonierten AdFL-PstI-Fragmente liegt. Von besonderer Bedeutung für weitere Arbeiten mit den AdFL-PstI-Klonen ist, daß diese Karte im Gegensatz zur älteren auf das PstI-Restriktionsmuster aufbaut.
Die Länge der Fragmente wurde durch einen Vergleich mit den sequenzierten Marker-Fragmenten in Basenpaaren so genau wie möglich angegeben. Methodisch bedingt muß man erfahrungsgemäß mit Abweichungen bis zu +/-5% von den angegebenen Größen rechnen, was bezogen auf die Gesamtlänge des AdFL-Genoms aber Fehler ergibt, die unter 0,5 % liegen. Da die elektrophoretischen Eigenschaften nicht nur von der Zahl der Basenpaare bestimmt wird, könnten sich bei einer Sequenzierung noch größere Differenzen ergeben.

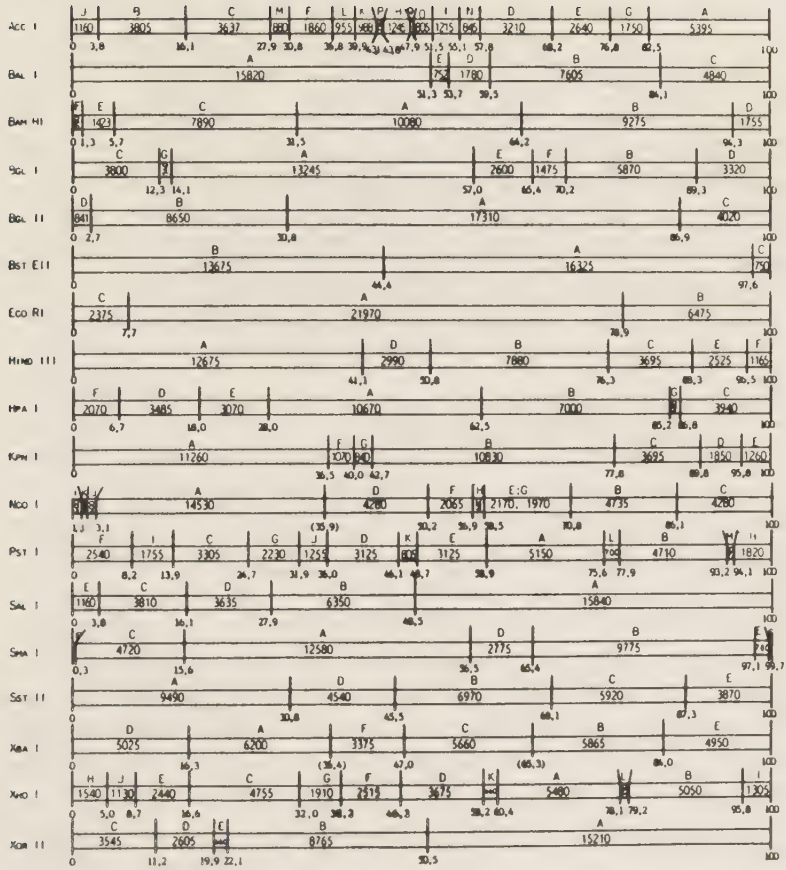


Abb. 4-52: Restriktionskarte von Mausadenovirus FL.
Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind in Längeneinheiten (map units) von 1-100 angegeben, die Fragmentgrößen in Basenpaaren.

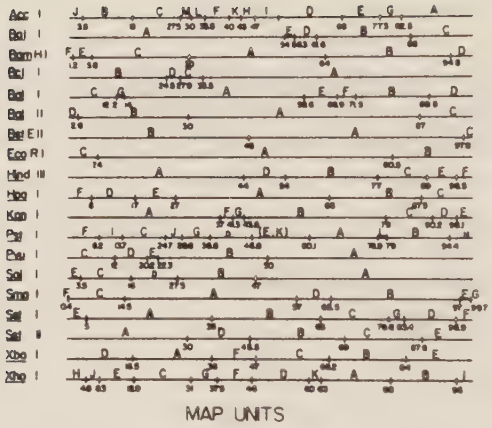


Abb. 4-52a: Die ältere Restriktionskarte von AdFL (Larsen et al., 1979)

5. DISKUSSION

5.1. Permissivität verschiedener Zellsysteme gegenuber einer Infektion mit AdFL

In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlauf einer Infektion mit Mausadenovirus FL in Maus-Zellen (Balb/c 3T3) und menschlichen Zellen (HeLa) untersucht. Dabei konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden, sowohl was die Quantität der virusspezifischen Makromoleküle (DNA, RNA, Proteine) betrifft, als auch den Zeitpunkt der Synthese. Aus diesem Grunde erschien es angebracht dem permissiven Mauszell-AdFL-System das semipermissive oder nicht-produktive menschliche Zell-AdFL-System gegenüberzustellen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Replikation der viralen DNA in beiden Systemen etwa gleich effizient abläuft. Allerdings beginnt sie im menschlichen System um etwa 11 Stunden später als im Mauszellsystem und erreicht auch ihren Höhepunkt um eine entsprechende Zeit verschoben. Im Gegensatz dazu wurden die Strukturproteine in HeLa-Zellen entweder nur in sehr geringen Mengen (Hexon) oder überhaupt nicht gefunden (Protein C). Unser System erinnert damit an Beobachtungen, die schon früher mit menschlichen Adenoviren in Affenzellen (AGMK = African Green Monkey Kidney - Rabson et al., 1964) und in Hamster-Zellen (CHO = Chinese Hamster Ovary - Longiaru und Horwitz, 1981) gemacht wurden. Allen drei Systemen gemeinsam sind die extrem geringen Ausbeuten an infektiösen Viruspartikeln und die weitgehend normal ablaufende DNA-Synthese.

Wenn Zellextrakte aus nicht-produktiv infizierten Zellen für die Infektion permissiver Zellen verwendet wurden, konnten nur sehr geringe Mengen infektiöser Partikel nachgewiesen werden. In HeLa-Zellen erreichten die Ausbeuten verglichen mit dem permissiven System maximal 1/500. Bezogen auf die Zellzahl ergibt das 0,0025 Partikel pro Zelle, d.h. aus je 400 Zellen wird ein Viruspartikel freigesetzt. Ähnlich ist die Situation in den

anderen beiden Systemen. Im Ad2-CHO-System ist die Virusausbeute gegenüber den permissiven HeLa-Zellen um den Faktor 6000 reduziert. Verglichen mit den üblicherweise sehr hohen Virustitern im Ad2-HeLa-System ergibt dies aber immer noch 0,3 infektiöse Partikel pro Zelle (Longiaru und Horwitz, 1981). In Ad12 infizierten Affenzellen sank die Infektiosität auf etwa 1/1000 ab (Rabson et al., 1964). Bei den geringen Zahlen ist jedoch nicht auszuschließen, daß hier wie in unserem System noch Virus bestimmt wurde, das bei der Infektion eingesetzt worden war. Der Versuch mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiertes Mausadenovirus (also neu gebildetes) durch Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation aus den nicht permissiven Zellen anzureichern, schlug fehl, obwohl ein radioaktiver Virusgipfel aus permissiven Zellen gut zu sehen war. Trotz kaum meßbarer Virustiter trat übrigens in allen drei beschriebenen Systemen ein deutlicher cytopathischer Effekt auf.

Verschiedene Versuche wurden unternommen, den Block, der die Bildung von Viruspartikeln verhindert, zu überwinden. Im Ad5(Ad12)-Affenzell-System gelang das durch Überinfektion mit SV40. Sowohl im Elektronenmikroskop als auch im Infektionstest konnte unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Virustiter auf 10^2-10^3 Partikel pro Zelle beobachtet werden (Rabson et al., 1964). Nachdem bekannt war, daß SV40 die Vermehrung von menschlichen Adenoviren in Affenzellen unterstützen kann, isolierte man Hybridviren, die Teile vom SV40-Genom integriert hatten, so z.B. Ad2+ND1 (Lewis et al., 1969; Grodzicker et al., 1976; Fey et al., 1979).Es war aber auch möglich die Wirtszellen durch Transformation mit SV40 dahingehend zu verändern, daß sie menschlichen Adenoviren (Ad2) die Vermehrung erlaubten (Hashimoto et al., 1973). Ferner ließen sich "host range"-Mutanten (d.h. Viren mit veränderter Wirtszellspezifität) isolieren, die keine SV40-DNA-Anteile enthielten und trotzdem auch ohne Helfervirus auf Affenzellen wuchsen (z.B. Ad2hr400). Die Mutation bei diesen Viren liegt in der E2A-Region, die für das DNA-bindende Protein kodiert (Klessig, 1977; Klessig und Hassell, 1978; Klessig und Grodzicker, 1979).

Versuche, den Syntheseblock von AdFL in HeLa-Zellen durch

Koinfektion mit Ad2 zu überwinden, wurden von uns durchgeführt. Dabei wurden sowohl die DNA-Synthese durch Puls-Experimente als auch die Bildung infektiöser Partikel durch Immunfluoreszenz überprüft. AdFL DNA-Synthese konnte jedoch weder bei gleichzeitiger Infektion mit Ad2 noch bei Überinfektion, die 24 Stunden später erfolgte, beobachtet werden. Virusstammlösungen, die aus AdFL- oder gemischt infizierten HeLa-Zellen gewonnen wurden, erwiesen sich in der Immunfluoreszenz auf 3T3-Zellen als etwa gleich infektiös. Im AdFL-HeLa-System scheint es also nicht möglich zu sein, mit Ad2 die AdFL-Produktion zu stimulieren, möglicherweise wird sie sogar unterdrückt. Allerdings muß eingeräumt werden, daß die Koinfektion der HeLa-Zellen mit Ad2 und AdFL experimentelle Schwierigkeiten erwarten läßt: So vergeht bei der AdFL-Vermehrung im 3T3-System von der Infektion bis zum Zelltod etwa doppelt so viel Zeit wie bei der Infektion von HeLa-Zellen mit Ad2. In HeLa-Zellen beginnt die Replikation von AdFL mit einer Zeitverschiebung von weiteren 11 Stunden, also erst etwa 40 Stunden nach Infektion, zu einem Zeitpunkt also, zu dem Ad2-infizierte HeLa-Zellen bereits beginnen, Viruspartikel freizusetzen. Hinzu kommt ein Mengenproblem: Eine Ad2-infizierte HeLa-Zelle produziert bis zu 10^5 Viruspartikel (Lenk, 1980) und damit 100-1000mal mehr als eine AdFL-infizierte 3T3-Zelle. Die sehr rasche und ergiebige Vermehrung von Ad2 könnte also möglicherweise eine normale Entwicklung von AdFL überdecken oder unterdrücken. Man sollte Doppelinfektionen deshalb vielleicht noch einmal mit einem Virus versuchen, dessen Vermehrung weniger schnell verläuft (z.B. mit Ad12).

5.2 DNA-Replikation

Da ich schon während meiner Diplomarbeit an dem Problem der Replikation viraler DNA, insbesondere über die Bedeutung der umgekehrten terminalen Repetition (ITR) für die Initiation der DNA-Replikation gearbeitet hatte, galt ihr auch unser besonderes Interesse bei den Untersuchungen an AdFL-infizierten HeLa- und

3T3-Zellen.

Wie im Ad2/Affenzell- und im Ad2/Hamsterzellsystem erreichte im AdFL/HeLa-System die DNA-Synthese etwa das gleiche Niveau wie in den entsprechenden permissiven Systemen (Reich et al., 1966; Hashimoto et al., 1973; Longiaru und Horwitz, 1981). Allerdings war in den beiden letztgenannten Systemen im Gegensatz zum Ad2/Affenzell-System eine zeitliche Verschiebung um 20 (Ad2/CHO) bzw. um 11 Stunden (AdFL/HeLa) zu beobachten. Die drei Beispiele zeigen, daß die Viren über die Wirtszellschranken hinaus in fremden Systemen repliziert werden können. Daraus muß man folgern, daß zwischen den Genomen von Ad2, Ad12 und AdFL gewisse Gemeinsamkeiten bestehen müssen.

Die Untersuchungen über den Mechanismus der DNA-Replikation sind bei Ad2 und Ad5 am weitesten fortgeschritten. Durch Versuche mit temperatursensitiven Mutanten und Verwendung von in-vitro-Replikationssystemen konnte gezeigt werden, daß sowohl wirtszell- als auch viruskodierte Proteine an der Replikation der viralen DNA mitwirken. So gelang es bisher, die Beteiligung von fünf Proteinen, nämlich zwei zellulären (Kernfaktor I und II) und drei viralen (Terminales Protein, DNA-bindendes Protein, Virus-Polymerase), nachzuweisen. Die beiden wirtszellspezifischen Proteine scheinen vor allem bei der Elongation mitzuwirken. Dabei zeigt Kernfaktor II eine Topoisomeraseaktivität, während Kernfaktor I spezifisch zwischen den Positionen 20 und 50 der umgekehrten Terminalen Repetition (ITR) von Adenovirus bindet und möglicherweise an der Initiation und Elongation beteiligt ist (Nagata et al., 1982, 1983). Viruskodiert ist das Terminale Protein (55k TP) beziehungsweise dessen Vorläufer (80k pTP = preterminal protein) (Stillman et Bellet, 1979; Stillman et al., 1981). Dieses Protein bildet zusammen mit der ebenfalls viruskodierten Polymerase (N-Gen Produkt; 140 kD) einen Komplex, der die Initiation der DNA-Replikation durchführen kann oder zumindest an ihr beteiligt ist (Enomoto et al., 1981; Stillman et al., 1982; Lichy et al., 1982; van Bergen et al., 1983).

Das multifunktionale DNA-bindende Protein (DBP; 72k-Protein) wirkt unter anderem bei der Elongation des neusynthetisierten

DNA-Stranges mit (van Bergen et al., 1983a), darf jedoch offensichtlich bei der Initiationsreaktion fehlen. Wahrscheinlich spielen noch sehr viel mehr Proteine bei der Replikation eine aktive Rolle. Die Aphidicholinsensitivität der Virus-DNA-Replikation läßt zudem das Mitwirken einer zellulären DNA-Polymerase, evtl. der Polymerase α, vermuten.

Da die beiden Enden der Adenovirus-DNA bei der Initiation (Ariga und Shimoyo, 1977; Sussenbach und Kuijk, 1978; Reiter et al., 1980) und der Termination (Tolun und Pettersson, 1975; Schilling et al., 1975; Bourgaux et al., 1976; Horwitz, 1976; Weingärtner et al., 1976; Sussenbach und Kuijk, 1977; Ariga und Shimojo, 1978; Arens und Yamashita, 1978) der DNA-Replikation besonders wichtig sind, hat man schon vor längerer Zeit damit begonnen, die terminalen Repetitionen verschiedener Adenoviren zu sequenzieren und miteinander zu vergleichen. Die Sequenzen von menschlichen Adenoviren aus allen fünf Subgruppen sind mittlerweile bekannt. Ihre Länge liegt zwischen 103 Basenpaaren bei Ad2 und 165 bei Ad12 und Ad18 (Ad5: Steenbergh et al., 1977; Ad2: Arrand und Roberts, 1979; Shinagawa und Padmanabhan, 1979; Ad12: Tolun et al., 1979; Sugisaki et al., 1980; Ad7: Dijkema und Decker, 1979a; Shinagawa und Padmanabhan, 1980; Ad4,9,10,31: Stillman et al., 1982a; Ad18: Garon et al., 1982).

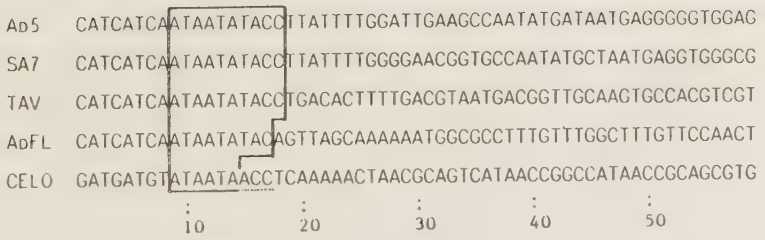


Abb. 5-1: Sequenzvergleich der DNA-Enden verschiedener Adenoviren

Auch von einigen nichtmenschlichen Adenoviren sind die Sequenzen bereits ermittelt (Affenadenovirus SA7: Tolun et al., 1979; Mausadenovirus FL: Temple et al, 1981; Vogeladenovirus CELO: Aleström et al., 1982a; Tupaja Adenovirus TAV: Brinckmann et al., 1983). Die kürzeste aller sequenzierten terminalen Repetitionen mit 63 Basenpaaren wurde bei CELO gefunden, die von Mausadenovirus ist 93 Basenpaare lang. Vergleicht man die terminalen Repetitionen aller menschlichen Adenoviren miteinander, so findet man 9-18 Basenpaare vom Ende entfernt eine 10 Basenpaare lange, allen gemeinsame Sequenz: ATAATATACC (Stillman et al., 1982a). Veränderungen in dieser Region findet man aber in den entfernter verwandten Animalviren wie AdFL und CELO (vgl. Abb. 5-1).

Verschiedene Wege wurden beschritten, die biologische Funktion dieser Konsensussequenz aufzuklären. Dies geschah vor allem in sog. in-vitro -Systemen in Kernrohextrakten oder teilweise gereinigten Proteinen aus Zellkernen adenovirusinfizierter Zellen. Einem solchen System kann man exogene DNA als Matrize zusetzen und dann entweder den Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden in die neu synthetisierte DNA oder die Bindung von markiertem dCMP an den Vorläufer des terminalen Proteins (pTP) als Nachweis für die Initiation der Replikation messen.

- Stillman et al. (1982a) haben nachgewiesen, daß alle menschlichen Adenoviren in homologen wie in heterologen in-vitro-Systemen sowohl initiiert als auch in voller Länge repliziert werden können (durchgeführt mit den menschlichen Adenoviren Ad2,7,9,31). Dabei bedeutet "Homologes System", daß die Zellen, aus denen der Kernextrakt gewonnen wird, mit dem selben Virusstamm infiziert werden, aus dem die DNA-Matrize stammt. Im heterologen System wurden die Zellen (HeLa) mit Ad2 infiziert, und Ad7,9,31 dienten als DNA-Matrize.
- Aus Versuchen mit klonierten Endfragmenten, die verkürzt wurden oder Mutationen enthielten, hat sich ergeben, daß Veränderungen innerhalb der Konsensussequenz nicht toleriert werden, d.h. in einem in-vitro -System inaktiv sind (Tamanoi und Stillman, 1983; van Bergen und van der Vliet, 1983b)

Nach den neuesten Ergebnissen aus unserem Labor mit chemisch

synthetisierten Teilstücken der terminalen Repetition kann ein 19 bzw. 21 Basenpaare langes Endfragment in Kernextrakten Ad2-infizierter HeLa-Zellen initiiert werden, ein 17 Basenpaare langes Endfragment dagegen nicht. (Gröger, W., und Dörper, T., pers.Mitteilung). Dieses Ergebnis ist vor allem insofern interessant, als genau an Position 18, die offensichtlich eine für die Initiationsreaktion ausschlaggebende Rolle spielt, die Homologie zwischen den menschlichen Adenoviren und Maus-AdFL zu Ende ist. In Einklang damit steht das Resultat, daß der AdFL-DNA-Proteinkomplex in Ad2-infizierten HeLa-Kernextrakten nicht initiiert werden kann. Das gleiche gilt für das reziproke Experiment, also Ad2-DNA in AdFL-infizierten 3T3-Zellen (heterologes System). Dagegen ist die Initiation von AdFL-DNA-Proteinkomplexen in Kernextrakten aus AdFL-infizierten HeLa- oder 3T3-Zellen (homologe Systeme) möglich. Entsprechende Ergebnisse wurden mit den klonierten AdFL-Endfragmenten erzielt (die in-vitro -Versuche sind ausführlicher in der Doktorarbeit von Frau C. Lally, 1984, dargestellt und diskutiert).

Die Resultate aus den in-vivo -Versuchen zur DNA-Replikation von Mausadenovirus im menschlichen und im Maus-Zellsystem konnten auf diese Weise in vitro nachvollzogen und bestätigt werden. Auch die bei Doppelinfektionen von HeLa-Zellen mit AdFL und Ad2 erzielten Ergebnisse, die bereits vorher diskutiert wurden, finden damit ihre Erklärung. Es war in vivo nicht möglich, die AdFL-DNA-Synthese in AdFL-infizierten HeLa-Zellen durch eine Überinfektion mit Ad2 zu steigern, wie das zu erwarten wäre, wenn die an der Replikation beteiligten Komponenten austauschbar wären. Man muß deshalb folgern, daß ein virus- und nicht ein wirtsspezifischer Faktor bei der Initiation oder Elongation der neuen DNA-Kette mitwirkt, der den streng konservierten Bereich an den Molekülenden erkennt, aber den Austausch einer einzigen Base in Position 18 nicht toleriert. Wahrscheinlich übernimmt diese Rolle eines der beiden viruskodierten Proteine, die an der Initiationsreaktion beteiligt sind (pTP oder 140k).

5.3. Das AdFL-Hexon - Sequenzhomologien zwischen AdFL und menschlichen Adenoviren

Der Beginn der sogenannten späten Phase der Virusinfektion fällt zeitlich mit der DNA-Replikation zusammen und endet mit der Freisetzung von Viruspartikeln. Nachdem bewiesen worden war, daß die DNA-Replikation im permissiven und nicht-permissiven System weitgehend normal ablief, aber keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden konnten, lag der Verdacht nahe, daß die Expression der sogenannten späten Gene an irgendeiner Stelle blockiert ist. In Pulsexperimenten mit ^{35}S-Methionin waren deutliche Unterschiede im Proteinmuster beider Systeme festzustellen. Mit Hilfe der Antiseren gegen virale Strukturproteine war es möglich, diese Proteine genauer zu charakterisieren. Weiter konnte durch Immunpräzipitation und Immunoblots gezeigt werden, daß das A-Protein in AdFL-infizierten HeLa-Zellen mindestens 50mal weniger hergestellt wird als im permissiven System. Das Protein C, das in Virionen in großer Menge vorkommt, war in HeLa-Zellen überhaupt nicht nachweisbar.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf das A-Protein gelegt, da es im permissiven System in großen Mengen synthetisiert wird und sich damit gut charakterisieren läßt. Zwei Hinweise sprechen dafür, daß es sich dabei um das AdFL-Hexon handelt:

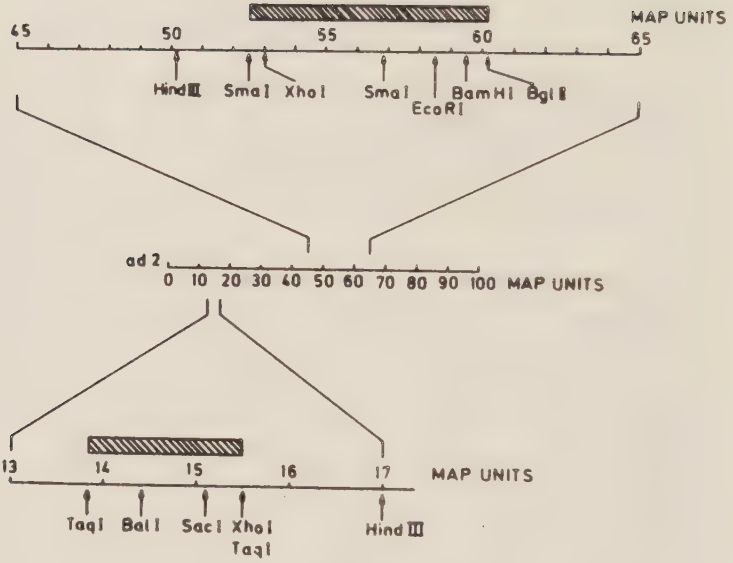
- Es ist das größte und weitaus am meisten synthetisierte AdFL-Strukturprotein, was auch für das Ad2-Hexon zutrifft.
- Antiseren gegen Ad2 und gegen das Ad2-Hexon zeigen sehr starke Kreuzreaktion mit diesem Protein. Eine solche wurde bei allen bisher untersuchten Adenoviren außer CELO gefunden, und das Hexon gilt deshalb als das adenovirusspezifische Antigen (Hartley und Rowe, 1960; Larsen und Nathans, 1977). Aus der immunologischen Ähnlichkeit der Hexonproteine verschiedener Adenoviren kann man weitreichende strukturelle Gemeinsamkeiten folgern, die möglicherweise auf der DNA-Ebene widergespiegelt werden.

Schon 1977 haben Larsen und Nathans AdFL- und Ad2-DNA durch DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente miteinander verglichen und

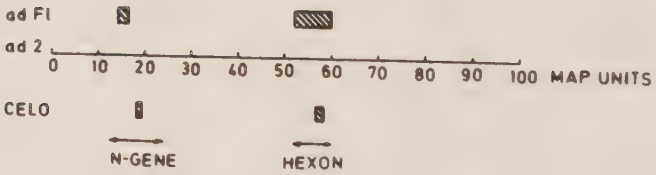
dabei eine Homologie von weniger als 10 % gefunden. Das läßt auf einen geringen Verwandtschaftsgrad zwischen den beiden Viren schließen, was auch später in Southernblot-Hybridisierungen noch einmal bestätigt werden konnte. Nur unter wenig strikten Hybridisierungsbedingungen (20-30 % Formamid; 37°C) bindet AdFL-DNA an die meisten HindIII-Fragmente von Ad2 (Antoine et al., 1982). Aus detaillierten Untersuchungen ging eine deutliche Hybridisierung zweier Bereiche hervor (Larsen und Nathans; 1979). Damals wurde radioaktiv markierte AdFL-DNA an Restriktionsfragmente von Ad2 hybridisiert und umgekehrt. In Zusammenarbeit mit einer schwedischen Arbeitsgruppe (Aleström, P. und Pettersson, U.) konnten wir diese homologen Bereiche durch eine sehr differenzierte Hybridisierungstechnik (Howley, 1979) unter mehr oder weniger strikten Bedingungen weiter einkreisen (Antoine et al., 1982). Die Hybridisierungsexperimente wurden allerdings nur in einer Richtung durchgeführt, d.h. radioaktiv markierte AdFL-DNA wurde an Restriktionsfragmente von Ad2 hybridisiert. Da verschiedene Restriktionsenzyme verwendet wurden, u.a. Taq I, das 4 Basen erkennt und deshalb meist sehr kleine DNA-Bruchstücke erzeugt, konnten die homologen Bereiche auf der Ad2-Restriktionskarte sehr genau kartiert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-2 zusammengefaßt. Die Teile A und B sind unserer Arbeit (Antoine et al., 1982) entnommen, Teil C zeigt das Ergebnis des umgekehrten Experiments (^{32}P-Ad2-DNA hybridisiert an AdFL-Restriktionsfragmente) und entstammt der Veröffentlichung von Larsen und Nathans (1979). Unter strikten Hybridisierungsbedingungen (Hybridisierung in 6 x SSC, 65°C; waschen in 2 x SSC, 65°C) wurden zwei Bereiche großer Homologie identifiziert:

Der größere Abschnitt liegt zwischen den Positionen 52,5 und 60,2 der Ad2-Karte und überspannt damit annähernd das ganze Ad2-Hexongen, welches inzwischen sequenziert und genau lokalisiert worden ist (Pos. 51,6-59,7). Es ist eine 2901 Basenpaare lange, intronfreie DNA-Sequenz und kodiert für ein Protein, das aus 967 Aminosäureresten besteht und ein Molekulargewicht von 108 kD aufweist (Jörnvall et al., 1981; Jörnvall und von Bahr-Lindström,

A



B



C

Abb. 5-2: Bestimmung homologer Regionen zwischen den DNA-Molekülen von Ad2 und AdFL. A und B aus Antoine et al. (1982); C aus Larsen et al. (1979). Erklärung im Text.

1981). Ein Vergleich der Laufeigenschaften des AdFL-Hexons mit denen des Ad2-Hexons auf denaturierenden Polyacrylamidgelen ergab ein Molekulargewicht von ca. 90 kD. Es ist damit etwa 15 % kleiner als das Ad2-Protein und erfordert eine Kodierungskapazität von mindestens 8 % des AdFL-Genoms. Der in Hybridisierungsexperimenten festgelegte Homologiebereich (Abb.5-2 Teil C; Larsen und Nathans, 1979) von 12 % ließe sich wahrscheinlich deshalb noch weiter einengen.

Die zweite konservierte Region liegt zwischen den Positionen 13,8 und 15,5 auf der Ad2-Karte. Aus den Sequenzdaten von Ad2 (Alestrom et al., 1982; Gingeras et al., 1982) weiß man, daß sich in diesem kleinen Bereich das N-Gen (22,9-14,2) und das Gen für das IVa2-Protein (15,6-11,2) überlappen. Das N-Gen kodiert wahrscheinlich für die virusspezifische DNA-Polymerase (140k), die bei der Initiation der DNA-Replikation eine wesentliche Rolle spielt. Eine Diskussion darüber, was das möglicherweise im Hinblick auf die DNA-Replikation zu bedeuten hat, wäre im Augenblick sicher verfrüht.

In Abbildung 5-2 sind auch die Hybridisierungsergebnisse mit CELO-Virus dargestellt. Dieses Virus, das mit menschlichen Adenoviren weniger gemeinsam hat als AdFL, zeigt ebenfalls zwei homologe Bereiche. Einer davon umfaßt ein 500 Basenpaare langes Fragment am rechten Ende des Hexongens, das dem Carboxyterminalen Teil des Proteins entspricht. Der andere liegt links im Bereich des N-Gens, aber bereits außerhalb des IVa2-Gens.

5.4 Transkription

Durch Homologiestudien zwischen Ad2 und AdFL auf der DNA-Ebene konnte gezeigt werden, daß der Bereich im AdFL-Genom, der wahrscheinlich für das Hexon kodiert, zwischen den Positionen 54 und 66 auf der AdFL-Karte liegt. Es sollte deshalb möglich sein, mit einem der klonierten AdFL-Fragmente, die diesen Abschnitt reprasentieren, die Hexon-mRNA durch Northernblot-Hybridisierungen zu charakterisieren. Am besten dafür geeignet erschienen das

PstI-E-Fragment oder das BamHI-B-Fragment, die auch dann Teile des Hexongens enthalten, wenn dieses kleiner als der Homologiebereich ist.

In dem gezeigten Northernblot wurde eine RNA im Größenbereich zwischen 2000 und 3000 Basen gefunden, die mit dem AdFL-BamHI-B-Fragment hybridisierte. Es waren aber keine qualitativen Unterschiede zwischen der zytoplasmatischen RNA aus AdFL-infizierten 3T3- oder HeLa-Zellen festzustellen. In den HeLa-Zellen wird zwar diese RNA in einer etwas geringeren Menge hergestellt; ob das jedoch wirklich die Hexon-mRNA ist und inwieweit damit die sehr stark reduzierte Hexonprotein-Synthese erklärt werden kann, muß noch untersucht werden.

Im Ad2-Affenzellsystem wurde entdeckt, daß die Fiber-mRNA teilweise anders gespleißt wird als im permissiven System (Klessig und Chow, 1981). Allerdings konnte man auch in diesem System damit nur zum Teil die um einen Faktor von 100 bis 1000 reduzierte Fiber-Synthese erklären. In einer neueren Arbeit beschreiben Anderson und Klessig (1983) Ergebnisse aus in-vitro - und in-vivo-Translationsversuchen. Dabei stellte sich heraus, daß die mRNA, die aus Ad2-infizierten Affenzellen isoliert worden war (auch die an Ribosomen gebundene) und in vivo weitgehend untranslatiert blieb, in in-vitro -Systemen ebenso effizient in Fiber-Protein übersetzt werden konnte wie aus permissiven Zellen isolierte Fiber-mRNA. Die Autoren schließen daraus, daß es einen Unterschied zwischen der Fiber-mRNA aus abortiv und produktiv infizierten Zellen geben muß, der auf die Translatierbarkeit in vivo, aber nicht in vitro einen Einfluß ausübt. Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf Defekten in mRNA-Spleißen, die weniger auffallend sind als die früher beschriebenen und deshalb bei den durchgeführten Untersuchungen nicht entdeckt werden konnten. Außerdem muß ein Faktor in Ad2-infizierten Affenzellen gefordert werden, der diese Veränderung erkennt und die Übersetzung der mRNA in das Fiber-Protein verhindert. In erster Linie denkt man dabei an das DNA-bindende Protein, das bei der Regulation der Translation viraler DNA eine Rolle spielt (Jay et al., 1981) und in Ad2-Viren,

die auf Affenzellen adaptiert sind, verändert ist (Ad2hr400).
In unserem System sind die Untersuchungen noch nicht so weit fortgeschritten. Zwar konnten keine Hinweise wie z.B. höhermolekulare RNA-Moleküle gefunden werden, die für ein fehlerhaftes RNA-Spleißen sprechen würden. Daß ein solcher Defekt wie im Ad2-Affenzellsystem mit eine Rolle spielt, ist jedoch nicht völlig auszuschließen. Allerdings sprechen die Ergebnisse eher für eine Hemmung auf der Translationsebene.
Für weitere Versuche müßte man zunächst die Hexon-mRNA eindeutig identifizieren. Dazu wiederum müßte man ein kleineres DNA-Fragment, das ausschließlich hexonkodierende Sequenzen enthält, als Hybridisierungsprobe verwenden. Die Lage dieses Fragments sollte durch Hybridisierungsexperimente auf der DNA-Ebene zwischen Ad2 und AdFL weiter eingegrenzt werden. Darüber hinaus müßte man die mRNA in ein in-vitro -Translationssystem einsetzen, um sie anhand ihres Produktes eindeutig identifizieren zu können.

5.5 Klonierung und Kartierung von AdFL

Zum Nachweis der AdFL-Transkripte war es notwendig, subgenomische DNA-Fragmente als Probe zur Verfügung zu haben. Am besten konnte das durch eine Klonierung geeigneter Restriktionsfragmente erreicht werden.
AdFL-DNA ergibt mit PstI geschnitten 13 Fragmente (A-M), die ca 300 bis 5150 Basenpaare lang sind. Elf dieser Fragmente konnten problemlos in pBR322, pUC7 oder pUC8 kloniert werden. Zwei Fragmente wurden trotz wiederholter Versuche nicht eingebaut (PstI A; PstI J). Durch Subklonierung gelang es schließlich, einen Teil des PstI-A-Fragments zu klonieren, so daß insgesamt nun über 90 % des AdFL-Genoms in Bakterien vermehrt werden können.
Um möglicherweise aus wenig klonierten DNA-Fragmenten das ganze AdFL-Genom rekonstruieren zu können, versuchten wir, sehr große Restriktionsfragmente in pUC8 zu klonieren. Das EcoRI-A-Fragment mit etwa 72 % des AdFL-Genoms konnte nie in voller Länge in einem

Klon gefunden werden. Dasselbe gilt für das BamHI-A-Fragment mit 34 % des Genoms. Mit gutem Erfolg ließen sich das BamHI-C- mit 24 % und das BamHI-B-Fragment mit 30 % klonieren. Allerdings erwiesen sich solche Plasmide als relativ instabil; die Aufzucht von Bakterienstämmen machte umso mehr Schwierigkeiten, je größer das eingebaute DNA-Stück war, und die Ausbeuten an Plasmid-DNA waren eher bescheiden.

Die Klonierung der Endfragmente bereitete sehr viel mehr Schwierigkeiten als die der internen Restriktionsfragmente. Der Grund dafür ist das terminale Protein, das kovalent an die 5'-Enden der Adenovirus-DNA gebunden ist und vor der Klonierung entfernt werden muß. Trotzdem gelang es die terminalen PstI-Fragmente zu klonieren. Als Vektor diente pUC8, das wegen seiner Polylinkerregion dafür besonders geeignet erschien. Die Konstruktion wurde so vorgenommen, daß sich die Plasmide möglichst nahe am ersten CAT der AdFL-DNA-Sequenz an einer der benachbarten Restriktionsschnittstellen des Polylinkers öffnen ließen. Mit EcoRI linearisiertes pGA613 (PstI-Fragment vom rechten Ende des AdFL-Genoms) ließ sich in einem in-vitro -Replikationssystem initiieren und bis zum ersten G-Rest der AdFL-Sequenz elongieren. Dagegen erwiesen sich mit dem selben Enzym linearisiertes pUC8 und circuläres pGA613 als inaktiv (Lally, 1984).

Die Neukartierung von AdFL mit Hilfe gereinigter Plasmid-DNA ermöglichte eine genauere Bestimmung von Restriktionsschnittstellen. Die Lage einiger kleinerer Fragmente wie beispielsweise das HpaI-G- und das XhoI-L-Fragment, deren Position in der älteren Karte von Larsen et al. (1979) nicht festgelegt werden konnte, wurde bestimmt. Die meisten Änderungen ergaben sich in der PstI-Karte, wo die Lage des M-Fragments und der Fragmente K und E zueinander unbekannt waren. Das PstI-G- und das PstI-J-Fragment waren in falscher Reihenfolge angeordnet. Außerdem konnte die AccI-Karte mit mindestens 16 Fragmenten weitgehend neu geordnet werden. Einige Unsicherheiten bestanden nach wie vor in den Bereichen, wo keine klonierten Fragmente zur Verfügung standen. Dort mußten die Schnittstellen festgelegt werden, indem AdFL-DNA mit den entsprechenden Enzymen geschnitten wurde . Die Lage

solcher Schnittstellen ist vor allem dann unsicher, wenn die benachbarten Erkennungsstellen des selben Enzyms weit entfernt liegen. Möglicherweise wurde auch die Reihenfolge mancher Schnittstellen, die sehr dicht im Abstand von weniger als 30 Basenpaaren aufeinanderfolgen, falsch dargestellt, obwohl gerade in solchen Fällen besonders darauf geachtet wurde, die fraglichen Fragmente unmittelbar nebeneinander auf dem Gel aufzutrennen.
Durch den Vergleich mit den sequenzierten λ- (Sanger et al., 1982) und pBR322-Restriktionsfragmenten (Sutcliffe, 1978, 1979) wurde versucht die Größe der kartierten Fragmente möglichst genau (in Basenpaaren) zu bestimmen. Für das Gesamtgenom ergibt sich als Durchschnittssumme verschiedener Restriktionsfragmente eine Länge von 30900 Basenpaaren, das heißt 1 % der AdFL-DNA entspricht 309 Basenpaaren.
Entgegen früheren Veröffentlichungen (Larsen und Nathans, 1977; Temple et al.1981) wurden die AdFL-Restriktionsfragmente in Übereinstimmung zu der Arbeit von Larsen et al. (1979) in umgekehrter Richtung angeordnet. Die Orientierung der Karte entspricht damit den bisher bekannten biologischen Funktionen (Verpackung der DNA, Lage des Hexongens) im Vergleich zu menschlichen Adenoviren und widerspricht der von Sharp (1977) vorgeschlagenen Orientierung nach physikalischen Kriterien, wonach das GC-reiche Ende links und das AT-reiche rechts liegen soll.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das AdFL-HeLa-System als Beispiel für ein nicht permissives Virus-Wirtszell-System beschrieben und näher charakterisiert.

In AdFL-infizierten 3T3- und HeLa-Zellen verläuft die Replikation der viralen DNA etwa gleich effizient. Im Gegensatz dazu produzieren die nicht permissiven HeLa-Zellen etwa 500mal weniger Viruspartikel als das permissive Maus-Zellsystem. Die Ursache für diesen Defekt konnte auf die deutlich reduzierte Synthese der viralen Strukturproteine zurückgeführt werden. Eines dieser Proteine wurde durch die Kreuzreaktion mit Antiseren, die gegen menschliche Viren gerichtet sind, als das AdFL-Hexon identifiziert. Seine Synthese ist in HeLa-Zellen um einen Faktor von 100 bis 200 reduziert. In Hybridisierungsversuchen zwischen der DNA von Adenovirus Typ 2 und Mausadenovirus FL konnte eine Region großer Homologie identifiziert werden, die auf dem Ad2 Genom für das Ad2-Hexon kodiert. Mit einer DNA-Probe des homologen Bereichs auf dem AdFL-Genom konnte in DNA/RNA-Hybridisierungsexperimenten eine RNA identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich die Hexon-mRNA ist. Da sich in beiden Systemen keine großen Unterschiede bezüglich der Größe und Menge dieser RNA fanden, muß man annehmen, daß der Defekt der Hexonsynthese auf der Translationsebene liegt.

Um eine Transkriptionskarte zu erstellen, wurden zunächst verschiedene AdFL-DNA-Restriktionsfragmente kloniert. Sie können als Hybridisierungsproben zur Identifizierung viraler RNA dienen. Die klonierten Fragmente repräsentieren etwa 95 % des viralen Genoms. Auch die beiden PstI-Endfragmente der viralen DNA konnten kloniert werden. Durch eine anschließende Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, daß diese Klone die Molekülenden in intakter Form enthielten. Klonierte Endfragmente lassen sich, wenn sie an einer geeigneten Restriktionsschnittstelle linearisiert werden, in einem in-vitro -Replikationssystem initiieren und elongieren (Lally, C., 1984). Mit Hilfe der klonierten AdFL-DNA-Fragmente gelang es schließlich, eine neue, verbesserte Restriktionskarte von AdFL zu konstruieren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Akusjärvi, G. and Pettersson, U. (1979). Sequence analysis of adenovirus DNA: Complete nucleotide sequence of the spliced 5'noncoding region of adenovirus 2 hexon messenger RNA. Cell 16 , 841-850.

Aleström, P., Akusjärvi, G., Pettersson, M., and Pettersson, U. (1982). DNA sequence analysis of the region encoding the terminal protein and the hypothetical N-gene product of adenovirus type 2. J. Biol. Chem. 257 , 13492-13898.

Aleström, P., Stenlund, A., Li, P., and Pettersson, U. (1982a). A common sequence in the inverted terminal repetitions of human and avian adenoviruses. Gene 18 , 193-197.

Anderson, C.W., Baum. P.R., and Gesteland, R.F. (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. J. Virology, 12 , 241-252.

Anderson, K.P. and Klessig, D.F. (1983). Post transcriptional block to synthesis of a human adenovirus capsid protein in abortively infected monkey cells. J. of Molecular and applied Genetics, 2, 31-43.

Antoine, G, Aleström, P., Schilling, R., Pettersson, U., and Winnacker, E.-L. (1982). Defective expression of mouse adenovirus FL in human cells. The EMBO J. 1 , 453-459.

Arens, M. and Yamashita, T. (1978). In vitro termination of adenovirus DNA synthesis by a soluble replication complex. J. Virology. 25, 698-702.

Ariga, H., and Shimojo, H. (1978). Initiation and termination sites of adenovirus 12 DNA replication. II. Analysis of pulse-labeled oligonucleotides derived from 5'-termini in the DNA strand. Virology 85 , 98-108.

Arrand, J. R., and Roberts, R. J. (1979). The nucleotide sequences of the termini of adenovirus-2 DNA. J. Mol. Biol. 128, 577-594.

van Bergen, B.G.M. and van der Vliet, P.C. (1983a). Temperature-sensitive initiation and elongation of adenovirus DNA replication in vitro with nuclear extracts from H5ts36-, H5ts149- and H5ts125-infected HeLa Cells. J. of Virology 46 , 642-648.

van Bergen, B.G.M., van der Ley, P.A., van Driel, W., van Mansfield, A.D.M., and van der Vliet, P.C. (1983b). Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein. Nucleic Acids Res. 11 1975-1989.

Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5'terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 , 3171.

Bernards, R., Vaessen, M.J., van der Eb, A.J., and Sussenbach, J.S. (1983a). Construction and characterization of an adenovirus type 5/adenovirus type 12 recombinant virus. Virology 131 , 30-38.

Bernards, R., Schrier, P.J., Houwelling, A., Bos, J.L., and van der Eb, A.J. (1983b). Tumorgenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. Nature 305, 776-779.

Bhaduri, S., Raskas, H.J., and Green, M. (1972). Procedure for the preparation of milligram quantities of adenovirus messenger RNA. J. Virology 10 , 1126

Bittner,M., Kupferer, P., and Morris, C. F. (1980). Electrophoretic tranfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoxylmethyl cellulose or nitrocellulose sheets. Anal. Biochemistry 102 , 459-471.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynder, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.

Gene 2 , 95-113.

Bourgaux, P., Delbecchi, L. and Bourgaux-Ramoisy, D. (1976). Initiation of adenovirus type 2 DNA replication. J. Virology 72, 89-98.

Boursnell, M.E.G., and Mautner, V. (1981). Recombination in adenovirus: Crossover sites in intertypic recombinants are located in regions of homology. Virology 112 , 198-209.

Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K., and Weintraub, H. (1979). The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res. 8 , 1-20.

Brinckmann, U., Darai, G. and Flügel, R. M. (1983). The nucleotide sequence of the inverted terminal repetition of the tree shrew adenovirus DNA. Gene 24 , 131-135.

Carlock, L.R. and Jones, N.C. (1981). Transformation-defective mutant adenovirus type 5 containing a single altered E1a mRNA species. J. Virol. 40 , 657-664.

Carmichael G. G., and McMaster, G. K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. MIE 65 , 380-391.

Carusi, E. (1977). Evidence for blocked 5'-termini in human adenovirus DNA. Virology 76 , 380-394.

Challberg, M.D. and Kelly, T.J. (1982). Eucaryotic DNA replication: Viral and plasmid model systems. Ann. Rev. Biochem. 51 , 901-934.

Chow, L.T., Gelinas, T.R., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977). An amazing Sequence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell 12 , 1.

Close, T.J., Christmann, J.L. and Rodriguez, R.L. (1983). M13 bacteriophage and pUC plasmids containing DNA inserts but still capable of ß-galactosidase-complementation. Gene 23 , 131-136.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69 , 2110-2114.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Royer, H.W., and Helling, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 70 , 3240.

Cross, F.R. and Darnell, J.E. (1983). Cycloheximide stimulates early adenovirus transcription if early gene expression is allowed before treatment. J. Virol. 45, 683-692.

Daniell, E. (1976). Genome structure of incomplete particles of adenovirus. Virology 19 , 685-708.

Desiderio, S. V. and Kelly, T. J. jr. (1981). Structure of the linkage between adenovirus DNA and the 55000 molecular weight terminal protein. J. Mol. Biol. 145, 319-337.

Deuring, R., Klotz, G., and Doerfler, W. (1981). An unusual symetric recombinant between adenovirus type 12 DNA and human Cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 , 3142-3146.

Dijkema, R. and Dekker, B.M.M. (1979a). The inverted terminal repetition of the DNA of weakly oncogenic adenovirus type 7. Gene 8 : 7-15.

Dijkema, R. Dekker, B.M.M., van der Feltz, M.J.M. and van der Eb, A.J. (1979b). Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. J. Virol. 32 , 943-950.

Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., and Goodman, H.M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96 , 171-184.

Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. Virology 8 , 396-397.

Dussaix, E., Faucon-Biguet, N., Samolyk, D., Boni, C., and Tournier, P. (1982). Restricted replication of mouse adenovirus FL in mouse balb/c cells transformed by simian adenovirus 7. Virology 116 , 641-645

van der Eb, A.J. (1973). Intermediates in type 5 adenovirus DNA replication. Virology 51 , 11-23.

van den Elsen, P.J., Houweling, A., and van der Eb, A.J. (1983). Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1A. Virology 131 , 242-246.

Enomoto, T., Lichy, J.H., Ikeda, J.-E. and Hurwitz, J. (1981). Adenovirus DNA replication *in vitro* : Purification of the terminal protein in a functional form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 , 6779-6783.

Everitt, E., Sandquist, B., Pettersson, U., and Philipson, L. (1973). Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. Virology 52 , 130-147.

Fey, G., Lewis, J.B., Grodzicker, T., and Bothwell, A. (1979). Characterization of a fused protein specified by the adenovirus type 2 - simian virus 40 hybrid $Ad2^{+}ND1dp2$. J. Virology 30 , 201-217.

Flint, S.J. (1981). DNA Tumor viruses. Edited by John Tooze. Cold Spring Harbor Laboratory.

Fütterer, J. and Winnacker, E.-L. (1984). Adenovirus DNA replication. Current Topics 111, 41-64

Gallimore, P.H., Sharp, P.A. and Sambrook, J. (1974). Viral DNA in transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. J. Mol. Biol. 89 , 49-72.

Garon, C.F., Berry, K.W., and Rose, J.A. (1972). A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 , 2391-2395.

Garon, C.F., Parr, R.P., Padmanabhan, R., Roninson, J., Garrison, J.W., Rose, J. (1982). Structural characterization of the adenovirus 18 inverted terminal repetition. Virology 121 , 230-239.

Gingeras, T.R., Sciaky, D., Gelinas, R.E., Bing-Dong, J., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A., Parsons, B.L., O'Neill, K., and Roberts, R.J. (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome. J. Biol. Chem. 257, 13475-13491.

Ginsberg, H.S., Bello, L.J. and Levine, A.J. (1967). Control of Biosynthesis of host macromolecules in cells infected with adenovirus. In "The molecular biology of viruses" (ed. J.S. Colter and W. Paranchych). Academic Press, New York, 547-572.

Goldin, A.L., Sandri-Goldin, R.M., C Levine, M. and Glorioso, J.C. (1981). Cloning of herpes simplex virus type 1 sequences representing the whole genome. J. Virol. 38, 50-58.

Graf, H. (1979). Optimization of conditions for the in vitro formation of hybrid DNA molecules by DNA ligase. Biochem. Biophys. Acta 564 , 225-234.

Graham, F.L., Abrahams, P.J., Mulder, C., Heijneker, H.L., Warnaar, S.O., de Vries, F.A.J., Fiers, W., and van der Eb, A.J. (1974). Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus SV40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 , 637.

Green, M., Pina, M., Kimes, R., Wensink, P.C., Machaffie, L.A., and Thomas, C.A. (1967). Adenovirus DNA. I molecular weight and conformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 1302-1309.

Green, M., Mackey, J.H., Wold, W.S.M., and Rigden, P. (1979). Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad 1-31) from five groups (A-E) based upon genome homologies. Virology 93 , 481-492.

Grodzicker, T., Lewis, J.B., and Anderson, C.W. (1976). Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. II. Ad2^{+}ND1 hostrange mutants that synthesize fragments of the Ad2^{+}ND1 30k protein. J. Virol. 19 , 559-571.

Grunstein, M. and Hogness, D.S. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 72 , 3961-3965.

Grunstein, M. and Wallis, J. (1979). Colony hybridization. Methods in Enzymology 68 , 379-389.

Hartley, J.S. and Rowe, W.P. (1960). A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. Virology 11 , 645-647.

Hashimoto, K., Sugiyama, T., and Sasaki, S. (1966). An adenovirus isolated from the feces of mice. I. Isolation and Identification. Japan. J. Microbiol. 10 , 115-125.

Hashimoto, K., Nakajima, K., Oda, K. and Shimojo, H. (1973). Complementation of translational defect for growth of human adenovirus type 2 in simian cells by a simian virus 40 induced factor. J. Mol. Biol. 81 , 207-223.

Heck, F.C., Sheldon, W.G., Gleiser, C.A. (1972). Pathogenesis of experimentally pruduced mouse adenovirus infection in mice. Am. J. Vet. Res. 33 , 841-846.

Helling, R.B., Goodman, H.M., and Boyer, H.W. (1974). Analysis of EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol, 14 . 1235.

Hilleman, M.R. and Werner, J.H. (1954). Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85 , 183.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.

Howley, P.M., Israel, M.A., Law, M.-F., and Martin, M.A. (1979). A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. J. Biol. Chemistry 254 , 4876-4883.

Horwitz, M.S. (1978). Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4291-4295.

Huebner, R.J., Casey, M.J., Canock, R.M., and Schell, K. (1965). Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3. Sharing of tumor antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus typ 1 tumors. Proc. Natl. Acad. Sci., 54 , 381-388.

Igarashi, K., Niiyama, Y., Tsukamota, K., Kurokawa, T., and Sugino, Y. (1975). Biochemical studies on bovine adenovirus type 3. II incompete virus. J. Virology 16, 634-641.

Jay, F.T., Laughlin, C.A., and Carter, B.J (1981). Eucaryotic translational control: Adeno-associated virus protein synthesis affected by a mutation in the adenovirus DNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2927-2931

Jörnvall, H., Akusjärvi, G. Aleström, P., von Bahr-Lindström, H., Pettersson, U., Appella, E. Fowler, A.V., and Philipson, L. (1981). The adenovirus hexon protein: The primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. J. Biol. Chem. 256 , 6181-6186.

Jörnvall, H. and von Bahr-Lindström, H. (1981). Fractionation of CNBr fragments and primary structure of peptides of the adenovirus hexon protein. J. Biol. Chem. 256 , 6187-6195.

Jones, N. and Shenk, T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 . 3665-3669.

Kathmann, P., Schick, J., Winnacker, E.-L., and Doerfler, W. (1976). Isolation and charakterization of temperatur-sensitive mutants of adenovirus type 2. J. Virol., 19 , 43-53.

Kausel, G. (1983). Transkriptionsprozesse in Maus-Adenovirus-FL-infizierten Zellen. Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München

Kelly, R.G., Cozzarelli, N., Deutscher, M.P., Lehman, I.R., and Kornberg, A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 245 , 39-45.

Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115 , 1617-1624.

Klessig, D.F. (1977a). Isolation of a variant of human adenovirus serotype 2 that multiplies efficiently on monkey cells. J. Virol., 21 , 1243-1246.

Klessig, D.F. (1977b). Two adenovirus mRNAs have a common 5' terminal leader sequence encoded at least 10 kb upstream from their main coding regions. Cell 12 , 9-21.

Klessig, D.F. and Hassell, J.A. (1978). Characterization of a variant of human adenovirus type 2 which multiplies efficiently in simian cells. J. Virology 28, 945-956.

Klessig, D.F. and Grodzicker, T. (1979). Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72k DNA binding protein. Cell 17 , 957-966.

Klessig, D.F. and Chow, L.T. (1980). Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected with human adenovirus type 2. J. Mol. Biol. 139, 221-242.

Kruijer, W., van Schaik, F.M., Speijer, J.G., and Sussenbach, J.S. (1983). Structure and function of adenovirus DNA binding protein: Comparison of the amino acid sequences of the Ad5 and Ad12 proteins derived from the nucleotide sequence of the corresponding genes. Virology 128 , 140-153.

Lally, C. (1984). The initiation of Adenovirus DNA-replication. Dissertation, Institut für Biochemie der Universität München.

Lally, C., Dörper, T., Gröger, W., Antoine, G., and Winnacker, E.-L. (1984). A size analysis of the adenovirus replicon. The EMBO Journal 3, 333-337.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Larsen, S.H. and Nathans, D. (1977). Mouse adenovirus: Growth of plaquepurified FL virus in cell lines and characterization of viral DNA. Virology 82 , 182-195.

Larsen, S.H., Mangolskee, R.F., and Nathans, D. (1979). Alignement of the restriction map of mouse adenovirus FL with that of human adenovirus 2. Virology 97 , 406-414.

Larsen, S.H. (1982) Evolutionary variants of mouse adenovirus containing cellular DNA sequences. Virology 116 , 573-580.

Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1977). Enhanced autoradiographic detection of $^{32}P_P$ and ^{1254}I using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Lett. 82 , 314.

Laskey, R.A. (1980). The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. Methods Enzymol. 65, 363.

Laver, W.G., Wrigley, N.G., and Pereira, H.G. (1969). Removal of pentons from particles of adenovirus type 2. Virology 39, 599-605.

Lechner, R.L., and Kelly, T.J. (1977). The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. Cell 12 , 1007-1020.

Lederberg, E.L. and Cohen, S.N. (1974). Tranformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. J. of Bacteriology 119 , 1072-1074.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16 , 4743.

Lenk, R., Storch, T., and Maizel, J. (1980). Cellarchitecture during adenovirus infection. Virology 105 , 19-34.

Lewis, A.M., Levin, M.J., Wiese, W.H., Crumpacker, C.S., and Henry, P.H. (1969). A nondefective (competent) adenovirus-SV40 hybrid isolated from the Ad2-SV40 hybrid population. Proc. Natl. Acad. Sci. 63 , 1128-1135.

Lichy, J.H., Field, J., Horwitz, M.S. and Horwitz, J. (1982). Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: Role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. Proc. Soc. Acad. Sci. USA 79 , 5225-5229.

Lillehaug J.R. and Kleppe, K. (1975). Kinetics and specificity of T4 polinucleotide kinase. Biochemistry 14 , 6, 1221-1225.

Lillehaug J.R., and Kleppe, K. (1975). Effect of salts and polyamines on T4 polynucleotide kinase. Biochemistry 14, 6, 1225-1229.

Lindberg, U., Persson, T., and Philipson, L. (1972). Isolation and charakterization of adenovirus mRNA in productive infection. J. Virology 10 , 909.

Lipp, M. (1981). Wirkung von Interferon auf die Genexpression von Herpes-simplex Virus aund Epstein-Barr Virus in lytisch infizierten und transformierten Zellen. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

Longiaru, M. and Horwitz, M.S. (1981). Chinese hamster ovary cells replicate adenovirus deoxyribonucleic acid. Molecular and Cellular Biology 1 , No.3, 208-215.

Maizel, J.V., White, D.O., and Scharff, M.D. (1968a). The polypeptides of adenovirus. I. evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of type 2, 7 and 12. Virology 36 , 115.

Maizel, J.V., White, D.O., and Scharff, M.D. (1968b). The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, topcomponents and the structure of the virion. Virology 36 , 126-136.

Mak, S. (1971). Defective virions in human adenovirus type 12. J. Virol. 7 , 426-433.

Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53 , 159-162.

Maniatis, T., Jeffrey, A., and van de Sande, H. (1975). Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 14 , 3787-3794.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Mautner, V. and Boursnell, M.E.G. (1983). Recombination in Adenovirus: DNA sequence analysis of crossover sites in intertypic recombinants. Virology 131 , 1-10.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 , 560-564.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65 , 499-560.

McMaster, G.K. and Carmichael, G.G. (1977). Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 , 4835.

Meinschad, Ch. and Winnacker, E.L. (1980). Recombination in adenovirus. I. Analysis of recombinant viruses under non-selective conditions. J. Gen. Virol. 48 , 219-224.

Meinschad, Ch. (1983). Rekombination und Replikation bei Adenoviren. Dissertation, Institut für Biochemie der Universität München.

Merril, C.R., Dunau, M.L. and Goldman D. (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 110, 201-207.

Montell, C., Fisher, E.F., Caruthers, M.H., and Berk, A.J. (1982). Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at mRNA splice sites. Nature 295, 380-384.

Morrison, D.A. (1977). Transformation in E.coli: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol. 132 , 349-351.

Morrison, D.A. (1979). Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. Methods in Enzymology 68 , 326-331.

Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Enomoto, T., Lichy, J.H.(1982). Adenovirus DNA replication in vitro: Identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 , 6438-6442.

Nagata, K., Guggenheimer, R.A. and Hurwitz, J. (1983). Adenovirus DNA replication in vitro: Synthesis of full length DNA with purified proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 , 4266-4270.

Nevins, J.R. (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. Cell 26, 213-220.

Nevins, J.R. (1982). Induction of the synthesis of a 70000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. Cell 29 , 913-919.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, R.N. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 105 , 361-363.

Ochs, C., McConkey, E.H., and Sammons, D.W. Silver stains for proteins in polyacrylamid gels: a comparison of six methods. Electrophoresis 1981, 2 , 304-307.

Peacock, A.C. and Dingman, C.W. (1968). Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by gelelectrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. Biochemistry 7 , 668-674.

Pearson, G.D., Chow, K.-C., Enns, R.E., Ahorn, K.G., Corden, J.L., and Harpst, J.A. (1983). In vitro replication directed by a cloned adenovirus origin. Gene 23 293-305.

Pereira, H.G. Adenoviruses of man and animals; International Symposium on Immunity to infections of the respiratory

system in man and animals, London 1974. Develop. biol. Standard., 28 , 28-41 (Karger Basel, 1975).

Persson, H., Monstein, H.-J., Akusjärvi, G. and Philipson, L. (1981). Adenovirus early gene products may control viral mRNA accumulation and translation in vivo. Cell 23, 485-496.

Persson, H. and Philipson, L. (1982). Regulation of adenovirus gene expression. Current Topics Microbiol. Immunol.

Pettersson, U. (1973). Some unusual properties of replicating adenovirus type 2 DNA. J. Mol. Biol. 81 , 521-527.

Philipson, L. (1983). Structure and assembly of adenoviruses; in: The molecular biology of adenoviruses I. ed. Dörfler, W. Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer Verlag. 109 , 1

Pina, M. and Green, M. (1965). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 54 , 547.

Pina, M. and Green, M. (1969). Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and non-oncogenic human adenoviruses. Virology 38 , 573-586.

Post, L.E., Conley, A.J., Mocarski, F.S. and Roizman, B. (1980). Cloning of reiterated an non reiterated herpes simplex virus 1 sequences as BamHI fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 , 4201-4205.

Prage, L., Pettersson, U., Höglund, S., Lonberg-Holm, K., and Philipson, L. (1970). Structural proteins of adenoviruses. IV. Sequential degradation of adenovirus type 2 virion. Virology 42 , 341-358.

Rabson, S.A., O'Conor, G.T., Berezesky, J.K., and Paul, F.J. (1964). Enhancement of adenovirus growth in African green monkey kidney cell cultures by SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 116 , 187-190.

Reich, P.R., Baum, S.G., Rose, J.A., Rowe, W.P. and Weissman, S.M (1966). Nucleic acid homology studies at adenovirus type 7-SV40 interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 55 , 336-341.

Reiter, T., Fütterer, J., Weingärtner, A., Winnacker, E.-L. (1980). Initiation of adenovirus DNA replication. J.Virol 35 , 662-671.

Rekosh, D.M.K., Russel, W.C., Bellet, A.J.D. and Robinson, A.J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. Cell 11 , 283-295.

Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 , 3116-3120.

Revet, B. und Benichou, D. (1981). Electron microscopy of Ad5 replicating molecules after in vivo photo crosslinking with trioxsalen. Virology 114 , 60-70.

Ricciardi, R.P., Jones, R.L., Cepko, C.L., Sharp, P.A., and Roberts, B.E. (1981). Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. 78 , 6121-6125.

Richardson, C.C. (1971). Polynucleotide kinase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. Proc. Nucleic Acid Res. 2 , 815.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113 , 237.

Roberts, R.J., Sciaky, D., Gelinas, R.E., Jiang, B.-D., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A., Parsons, B.L., O'Neill, K.E., and Gingeras, T.R. (1982). Information content of the adenovirus-2 genome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 17 , 1025-1037.

Robinson, A.J., Younghusband, H.B., and Bellett, A.J.D. (1973). A circular DNA-Protein complex from adenoviruses.

Virology 56 , 54-69.

Robinson, A.J. and Bellet, A.J.D. (1974). A circular DNA-protein complex from adenovirus and its possible role in DNA-replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 523-530.

Rossini, M. (1983). The role of adenovirus early region 1A in the regulation of early regions 2A and 1B expression. Virology 131 , 49-58.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gillmore, L.K., Parrott, R.H., and Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84 , 570.

Roychoudhuny, R., Jay, E., and Wu, R (1976). Terminal labelling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nuc. Acids Research 3 , 863-877.

Russell, W.C., McIntosh, K., and Skehel, J.J. (1971). The preparation and properties of adenovirus cores. J. Gen. Virology 11 , 35-46.

Russell, W.C., Newman, C., and Williamson, D.H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature 253, 5461.

Sammons, David, W., Adams, Lonnie, D., and Nishizawa, Edward E. (1981). Ultrasensitiv silver-based colorstaining of polypeptides in polyacrylamid gels. Electrophoresis, 2, 135-141.

Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. and Peterson, G.B. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage Lambda DNA. J. Mol. Biol. 162 , 729.

Schaffner, W. and Weissmann, C.. A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochemistry 56 , 502-514.

Schilling, R., Weingärtner, B., and Winnacker, E.L. (1975). Adenovirus type 2 DNA replication. II Termini of DNA replication. J. Virol., 16 , 767-774.

Schrier, P.J., Bernards, R., Vaessen, R.T.M.J., Houwelling, A., and van der Eb, AJ. (1983). Expression od class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. Nature 305 , 771-775.

Sharp, P.A. (1977). Adenovirus strand nomenclature: a proposal. J. Virol. 22 , 830-831.

Sharp, P.A., Sudgen, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose. Biochemistry 12, 3055.

Shaw, A.R. and Ziff, E.B. (1982). Selective inhibition of adenovirus type 2 early region II and III transcription by an anisomycin block of protein synthesis. Mol. Cell. Biol. 2 , 789-799.

Shingawa, M. and Padmanabhan, R. (1979). Nucleotide sequences at the inverted terminal repetition of Ad2 DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87 , 671-678.

Shinagawa, M., and Padmanabhan, R. (1980). Comparative sequence analysis of the terminal repetitions from different adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 , 3831-3835.

Smith, A.E., Smith, R., and Paucha, E. (1978). Extraction and fingerprint analysis of simian virus 40 large and small T-antigen. J. Virol., 28 , 140-153.

Smith, G.E. and Summers, M.D. (1980). The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyl-oxymethyl-paper. Analytical Biochemistry 109, 123-129.

Smith, H.O. (1980). Recovery of DNA from gels. Methods Enzymol. 65, 371.

Smith, K.O., Gehle, W.D., and Trousdale, M.D. (1965). Architecture of the adenovirus capsid. J. of Bacteriology 90 , 254-261.

Solnick, D. and Anderson, M.A. (1982). Transformation-deficient adenovirus mutant defective in expression of region 1A but not region 1B. J. Virol. 42 , 106-113.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 , 503-517.

Southern, E. (1980). Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods Enzymol. 68 , 152-182.

Steenbergh, P.H., Maat, J., van Ormondt, H., and Sussenbach, J.S. (1977). The nucleotide sequence at the termini of adenovirus type 5 DNA. Nucleic Acids Res. 4, 4371-4389.

Stillman, B.W. and Bellett, A.J.D. (1979). An adenovirus protein associated with the ends of replicating DNA molecules. Virology 93 , 69-79.

Stillman, B.W., Lewis, J.B., Chow, L.T., Mathews, M.B., and Smart, J.E. (1981). Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. Cell 23 , 497-508.

Stillman, B.W., Topp, W.C.and Engler, J.A. (1982a). Conserved sequences at the origin of adenovirus DNA replication.J. Virol. 44 , 530-537.

Stillman, B.W, Tamanoi, F., and Mathews, M.B. (1982b). Purification of an adenovirus coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication. Cell 31 , 613-623.

Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroll, K., Saito, I., Shimojo, Y., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S.-I., and Fujinaga, K. (1980). Structrue and gene organization of the transforming HindIII-G fragment of Ad12. Cell 20 , 777-786.

Sugiyama, T., Hashimoto, K., and Sasaki, S. (1967). An adenovirus isolated from the feces of mice. II Experimental infection. Japan. J. Microbiol. 11 , 33-42.

Sussenbach, J.S., Ellens, D.J., and Jansz, H.S. (1973). Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. II. The nature of single-stranded DNA in replicative intermediates. J. Virol. 12 , 1131-1138.

Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G. (1977). Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. V. The location of the termini of replication. Virology 77 , 149-157.

Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G. (1978). The mechanism of replication of adenovirus DNA. VI. Localization of the origins of the displacement synthesis. Virology 84 , 509-517.

Sutcliffe, J.G. (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucleic Acids Res. 5 , 2721-2728.

Sutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 , 77-90.

Symington, J., Green, M., and Brackmann K. (1981). Immunoautoradiongraphic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: Analysis of adenovirus encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 78 , 177-181.

Tal, J., Craig, E.A., and Raskas, H.J. (1975). Sequence relationships between adenovirus 2 early RNA and viral RNA size classes synthesized at 18 hours after infection. J. Virol. 15 , 137.

Tamanoi, F. and Stillman, B.W. (1982). Function of the adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 , 2221-2225.

Tamanoi, F. and Stillman, BW. (1983). Initiation of adenovirus DNA replication in vitro requires a specific DNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 , 6446-6450.

Temple, M., Antoine, G., Delius, H., Stahl, S., and Winnacker, E.L. (1981). Replication of mouse adenovirus strain FL DNA. Virology, 109 , 1-12.

Tibbetts, C. (1977). Viral DNA sequences from incomplete particles of human adenovirus type 7. Cell 12 , 243-249.

Thomas, P. (1980). Hybridization of denatured RNA and small RNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl.

Acad. Sci. 77 , 5201-5205.

Tolun, A. and Pettersson, U. (1975). Termination sites for adenovirus type 2 DNA replication. J. Virol. 16 , 759-766.

Tolun, A., Aleström, P., and Pettersson, U. (1979). Sequence of the inverted terminal repititions from different adenoviruses: demonstration of conserved sequences and homology between SA7 termini and SV 40 DNA. Cell 17 , 705-713.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 , 4350-4354.

Trentin, J.J., Yabe, Y., and Taylor, G. (1962). The quest of human cancer viruses. Science 137 , 835.

Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268.

Vogt, P.K. (1969) in Habel, K. and Salzman, N.P. (eds). Fundamental techniques in virology. Academic Press, NY/London, pp.316-326.

Wadell, G. (1979). Classification of human adenovirus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. Intervirology 11 , 47-57.

Wadell, G., de Jong, J., Lindman, K., Sundell, G., Svensson, L., and Uhnoo, I. (1983). Molecular epidemiology of adenoviruses: Evaluation of the genome type versus the serotype concept. Gulbenkian workshop on the Molecular Biology of Adenoviruses, June 1983, Sintra/Portugal.

Weingärtner, B., Winnacker, E.-L., Tolun, A., Pettersson, U. (1976). Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication. Cell 9 , 259-268.

Winnacker, E.-L. (1978). Adenovirus DNA: Structure and function of a novel replicon. Cell 14 , 761-773.

Wolfson, J., and Dressler, D. (1972). Adenovirus 2-DNA contains an inverted terminal repetition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 , 3054-3057.

Winocour, E. (1963). Purification of polyoma virus. Virology 19 , 158-168.

Zain, S., Sambrook, J., Roberts, R.J., Keller, W., Fried, M., and Dann, A.R. (1979). Nucleotide sequence analysis of the leader segments in a cloned copy of adenovirus 2 fiber mRNA. Cell 16 , 851-861.

Ziff, E.B. and Evans, R.M. (1978). Coincidence of the promotor and capped 5'-terminus of RNA from adenovirus 2 major lat transcription unit. Cell 15 , 1463-1475.

Ziff, E.B. (1980). Transcription and RNA processing by the DNA tumor viruses. Nature, 287 , 491-499.

Lebenslauf

Name:	Gerhard Antoine
Geburtsdatum:	5.5.1952
Geburtsort:	München
Eltern:	Alfons Antoine Elisabeth Antoine, geb. Greska
1959-1963:	Volksschule Neukeferloh
1963-1972:	Wilhelmsgymnasium und Oskar-von-Miller-gymnasium München
1972:	Abitur
WS 1972/73:	Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1975:	Diplomvorprüfung
1978:	Diplomhauptprüfung
Nov.1978-Sept.1979:	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Universität München
Nov.1979-Nov.1983:	Doktorarbeit am selben Institut